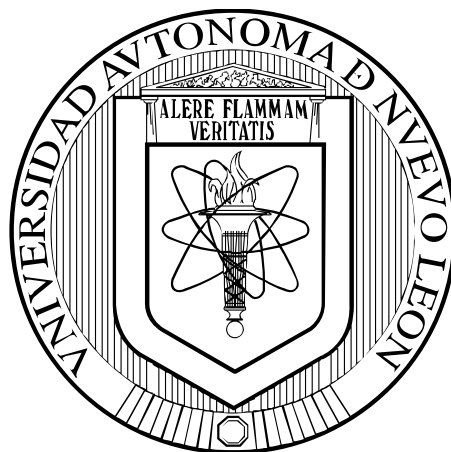


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**T E S I S**

**INACTIVACIÓN DE ESPORAS DE *FUSARIUM*, *ASPERGILLUS* Y  
SUS METABOLITOS FB<sub>1</sub> Y AFB<sub>1</sub> CON SOLUCIÓN  
ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN EN SEMILLAS DE  
JITOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)**

PRESENTA

MARCELA CHÁVEZ BAUTISTA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

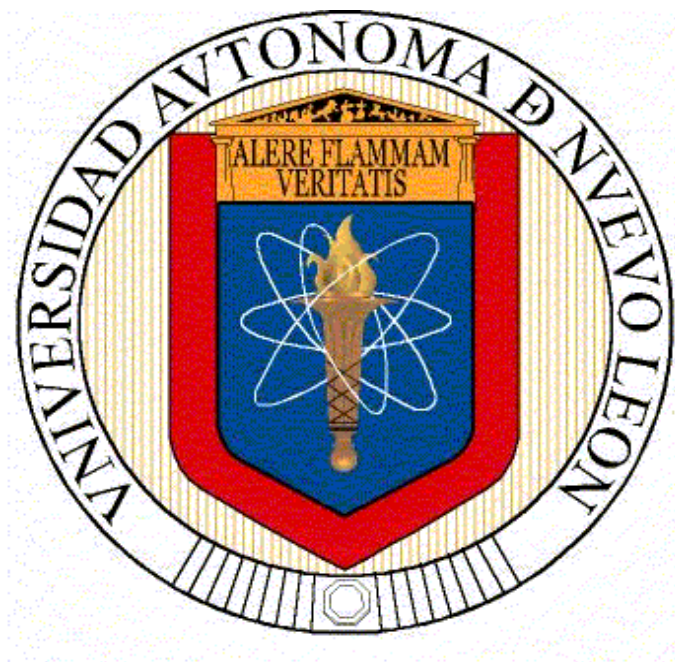
**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

DICIEMBRE, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**T E S I S**

**INACTIVACIÓN DE ESPORAS DE *FUSARIUM*, *ASPERGILLUS* Y  
SUS METABOLITOS FB<sub>1</sub> Y AFB<sub>1</sub> CON SOLUCIÓN  
ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN EN SEMILLAS DE  
JITOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)**

**QUE PRESENTA**

**MVZ. MARCELA CHÁVEZ BAUTISTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**GENERAL ESCOBEDO, N.L.,**

**DICIEMBRE DE 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**INACTIVACIÓN DE ESPORAS DE *FUSARIUM*, *ASPERGILLUS* Y SUS  
METABOLITOS FB<sub>1</sub> Y AFB<sub>1</sub> CON SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE  
SUPEROXIDACIÓN EN SEMILLAS DE JITOMATE (*SOLANUM  
LYCOPERSICUM*)**

**Aprobación de tesis por el comité particular de**

**MVZ. Marcela Chávez Bautista**

**Ph.D. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona**  
**Asesor Principal**

**Dr. Abraham Méndez Albores**  
**Asesor Externo**

**Dr. Jorge Ariel Torres Castillo**  
**Asesor Externo**

**Dra. Patricia González Barranco**  
**Asesor Externo**

**Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado**  
**Asesor Externo**

**GENERAL ESCOBEDO, N.L.**

**DICIEMBRE DE 2015**

## **DEDICATORIA**

Este documento va dedicado a la Ph.D. Alicia Marroquín, ya que me brindó su plena confianza para realizar este trabajo de investigación así como también me motivó en el proceso del mismo al ver su pasión por la investigación científica, y a mis padres y abuelos por motivarme a obtener una educación profesional desde la infancia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi comité de tesis que gracias a su apoyo pudimos concretar este trabajo que me llena de satisfacción.

A toda mi familia que durante todo este proceso estuvieron al pendiente de mi progreso y me alentaron a seguir, así como a mis amigos que al igual que mi familia siempre tenían buenos consejos, todos ustedes fueron un gran motor, gracias por su cariño incondicional.

A mis compañeros de maestría por su ayuda en los estudios; y aunque fue muy breve el tiempo que pudimos compartir juntos agradezco su apoyo durante este ciclo.

Finalmente al CONACYT, que mediante la beca asignada con No. de apoyo 365715 pude concretar este grado académico en un programa inscrito al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

## ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
AF	Aflatoxina
ACN	Acetonitrilo
ACS	Sociedad Química Americana
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Agrícolas
DON	Deoxinivalenol
FB	Fumonisina
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
g	Gramo
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Desempeño
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K <sup>+</sup>	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Ion magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio

min	Minutos
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
m/z	masa/carga
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
•OH	Radical hidroxilo
PDA	Agar papa dextrosa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDA	Agar sabouraud dextrosa
SES	Solución Electrolizada de Superoxidación
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
ZEN	Zearalenona
(\$/Ton)	Precio/tonelada

ÍNDICE	Página
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.3. HIPÓTESIS.....	6
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	7
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	8
2.1. Producción de jitomate en México y pérdidas por hongos.....	8
2.2. Hongos que afectan al jitomate .....	9
2.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	10
2.2.2. <i>Fusarium verticillioides</i> .....	12
2.2.3. <i>Aspergillus flavus</i> .....	14
2.2.4. <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	16
2.3. Micotoxinas.....	17
2.3.1. <i>Fumonisin</i> as .....	18
2.3.2. <i>Aflatoxinas</i> .....	19



2.4. Estrategias para reducir contaminación fúngica en semillas.....	21
2.4.1. Fungicidas.....	22
2.4.2. Soluciones Electrolizadas de Superoxidación.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Materiales.....	29
3.2. Inoculación de semillas de jitomate y aplicación de la SES.....	30
3.3. Conteo de esporas.....	31
3.4. Pruebas de germinación.....	33
3.5. Efecto de la SES sobre parámetros nutricionales.....	34
3.6. Efecto de la SES sobre las micotoxinas.....	35
3.7. Análisis estadístico.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Estabilidad de la SES.....	39
4.2. Resultados de las pruebas de efectividad de la SES.....	40
4.3. Resultados de las pruebas de inocuidad de la SES.....	44
4.4. Resultados de cromatografía de AFB <sub>1</sub> por UPLC.....	47
4.5. Resultados de conversión de AFB <sub>1</sub> por MS.....	49
4.6. Resultados de la reducción de FB <sub>1</sub> por fluorimetría.....	52

5. DISCUSIÓN.....	53
6. CONCLUSIONES.....	59
7. LITERATURA CITADA.....	60

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
1. Niveles de cloro libre y pH en la SES antes y después de su uso.....	39
2. Efectividad de la SES sobre <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> .....	41
3. Inocuidad de la SES en la germinación.....	44
4. Inocuidad de la SES sobre los parámetros nutricionales.....	47

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Características macroscópicas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	10
2. Tipos de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	11
3. Marchitamiento por <i>Fusarium</i> en planta de jitomate.....	12
4. Tipos de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	13
5. Semillas de jitomate contaminadas con <i>F. verticillioides</i> en medio PDA...	14
6. Características microscópicas y macroscópicas de <i>A. flavus</i> .....	15
7. Características macroscópicas de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	16
8. Estructura química de la fumonisina B <sub>1</sub> .....	18
9. Estructura química de la aflatoxina B <sub>1</sub> .....	20
10. Equipo de electrolisis para generar la SES.....	26
11. Esquema del generador de SES.....	27
12. Esporas de <i>A. flavus</i> normales y tratadas con SES de pH neutro.....	28
13. Cámara Neubauer ISOLAB.....	32
14. Cuadrantes de cámara Neubauer.....	33
15. Efectividad de la SES sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .....	42
16. Efectividad de la SES sobre <i>Fusarium verticillioides</i> .....	42
17. Efectividad de la SES sobre <i>Aspergillus flavus</i> .....	43
18. Efectividad de la SES sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	43
19. Porcentaje de germinación con la SES a las 48 horas.....	45
20. Porcentaje de germinación con la SES a las 72 horas.....	45

21. Porcentaje de germinación con la SES a las 96 horas....	46
22. Cromatograma de la SES 60 con AFB <sub>1</sub> a 20 ng/mL.....	48
23. Cromatograma de la SES 60 con AFB <sub>1</sub> a 100 ng/mL.....	49
24. Masa de AFB <sub>1</sub> a 20 y 100 ng/mL.....	50
25. Masas de compuestos de conversión de AFB <sub>1</sub> incubada con SES.....	51
26. Reducción de concentración de FB <sub>1</sub> con la SES.....	52

## RESUMEN

La presencia de hongos fitopatógenos en cultivos de jitomate representa un problema económico importante en México. Los hongos *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) y *Fusarium verticillioides* (*F. verticillioides*) pueden estar presentes en estos cultivos durante todas sus etapas de crecimiento. Otros hongos como *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) y *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*) también pueden contaminar estos cultivos aunque en menor medida. Debido a que la infección de un cultivo se puede originar desde el proceso de siembra, la integridad de las semillas es un factor central para los productores. El uso de la SES de pH neutro es una estrategia eficaz para reducir la contaminación fúngica en diversos alimentos. El objetivo fue evaluar la efectividad de la SES de pH neutro para reducir la presencia de esporas de *Fusarium* y *Aspergillus* en semillas de jitomate infectadas artificialmente así como evaluar los efectos de la SES sobre metabolitos importantes de los hongos tales como FB<sub>1</sub> y AFB<sub>1</sub>. Para los experimentos se emplearon semillas de jitomate El Cid F1 (Harris Moran Seed Company) saladette. Las cepas de hongos utilizadas fueron donadas por la FESC, de la UNAM. La SES de pH neutro ( $7 \pm 0.05$ ) a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre se obtuvo de Esteripharma S.A. de C.V. El cloro comercial al 6.5 % ( $\approx 62,000$  mg/L de cloro libre) y agua ultrapura de  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  (megaoms) filtrada en equipo Simplicity® (Merk Millipore Co.) se usaron como controles. Se inocularon las semillas con los hongos en una suspensión de esporas que contenía  $2\text{-}2.5 \times 10^6$  esporas/mL. Los grupos de tratamientos fueron: 1) Cloro, 2) Agua, 3) SES a 10 mg/L de

cloro libre, 4) SES a 40 mg/L de cloro libre, y 5) SES a 60 mg/L de cloro libre. Cada grupo estaba conformado de 50 semillas por placa y 4 réplicas por cada tratamiento. Se evaluaron 4 tiempos distintos de inmersión en la SES (5, 10, 15 y 20 min). La inocuidad de la SES se evaluó mediante análisis de propiedades nutrimentales (análisis proximales de semillas expuestas a SES 60 mg/L de cloro libre) y pruebas de germinación. Los resultados de efectividad y pruebas de germinación fueron analizados con métodos no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney y los análisis proximales con la prueba T-test. Los efectos de la SES sobre las micotoxinas fueron evaluados mediante UPLC, MS y fluorometría. La efectividad en la reducción de la producción de esporas fue mejor con la SES 60. La germinación y los parámetros nutricionales no se vieron afectados por el uso de la SES. Se documentaron cambios estructurales en la AFB<sub>1</sub> con la SES mediante UPLC y mediante MS se obtuvo evidencia de la conversión de la AFB<sub>1</sub> a otro compuesto que se está investigando; respecto a la FB<sub>1</sub> se obtuvo una reducción de hasta 26% empleando la SES a 60 mg/L de cloro libre y esta degradación fue dependiente de la concentración. Con esto se concluye que el uso de la SES de pH neutro puede ser una estrategia efectiva para reducir la contaminación fúngica en semillas de jitomate siendo un tratamiento inocuo que además es capaz de alterar la estructura de micotoxinas importantes producidas por estos hongos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La inminente presencia de hongos fitopatógenos y sus metabolitos tóxicos en los cultivos es un gran riesgo para la salud humana y animal. Los cultivos se pueden contaminar con hongos en cualquier estado de crecimiento, desde las semillas hasta la planta en pie. Si estos hongos contaminan las semillas, la probabilidad de contaminación de las plantas adultas y sus frutos incrementa drásticamente (Shinha y Bhatnagar, 1998). Para el control de estos hongos en las semillas usualmente se emplean fungicidas, sin embargo muchos de ellos pueden dejar residuos tóxicos que representan un riesgo para quien los aplica o llega a consumir frutos contaminados (Song et al., 2004; Cereser et al., 2001; Maita et al., 1991). Por tal motivo, hay una constante búsqueda de nuevos productos inocuos para reducir la presencia de estos hongos (Buck et al., 2002). La contaminación con hongos genera pérdidas en oportunidades de ventas de frutos nacionales y hacia el extranjero por incumplimiento de los límites permisibles de microorganismos y/o toxinas presentes en los alimentos, o por el tiempo tan corto de vida de anaquel que tienen los alimentos contaminados (Productores de Hortalizas, 2006). Por esta razón, es necesario encontrar estrategias para reducir la presencia de hongos fitopatógenos en los cultivos y brindar al consumidor alimentos inocuos que no comprometan su salud.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*), un fruto importante en México es comúnmente infectado por *F. oxysporum*, la diseminación de este patógeno



puede ocurrir a través de semillas infectadas, esporas transportadas por el viento, manejos de suelo en preparación de cultivo, plantas enfermas o herramientas contaminadas. La temperatura óptima de desarrollo es de 28 °C. El hongo puede permanecer en el suelo durante años y penetrar a través de las raíces hasta el sistema vascular (Productores de Hortalizas, 2006). *F. verticillioides* es un patógeno principalmente en el maíz pero también afecta otras especies de cultivos (Jurgenson et al., 2002).

Los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* son fitopatógenos que llegan a infectar al jitomate y bajo ciertas condiciones producen micotoxinas tales como las aflatoxinas (AF) (Nishikawa et al., 2006; Horn, 2009; Hedayati et al., 2007; IARC, 2012). La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), es uno de los hepatocarcinógenos más potentes y se ha clasificado como carcinógeno humano del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 2002). Por su relevancia, controlar la contaminación por aflatoxinas en alimentos es un asunto de interés global (Xiong et al., 2012). Las fumonisinas otro grupo de micotoxinas son producidas principalmente por *F. verticillioides* (Leslie y Summerell, 2006). La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) es el metabolito mayormente producido por *F. verticillioides* y es importante debido a su clasificación como carcinógeno del grupo 2B de la IARC (Marasas, 2001). Dentro de los efectos tóxicos de la FB<sub>1</sub> se asocian comúnmente la leucoencefalomalacia en equinos, el edema pulmonar en cerdos, y el cáncer hepático en ratas y en humanos, la exposición a FB<sub>1</sub> se ha asociado con un incremento en el riesgo de cáncer de esófago

(Lamprecht et al., 1994) y de problemas del desarrollo del tubo neural (Marasas et al., 2004).

Está comprobado que el uso de las SES con pH neutro en la industria alimenticia ha sido un éxito para la inactivación de hongos, eliminando esporas e hifas, y ofreciendo las ventajas de ser un producto amigable con el ambiente (Buck et al., 2002) por lo que el uso de ésta para controlar la contaminación en semillas tiene alto potencial.

## **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de la solución electrolizada de superoxidación (SES) con pH neutro para reducir la presencia de hongos fitopatógenos en semillas de jitomate y para la conversión *in vitro* de micotoxinas importantes de estos hongos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la SES a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 min) en la descontaminación de semillas de jitomate infectadas con *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. verticillioides* y *F. oxysporum*.
2. Evaluar los efectos de la SES sobre los metabolitos fúngicos AFB<sub>1</sub> y FB<sub>1</sub>, carcinógenos del grupo 1 y 2B, respectivamente.
3. Evaluar los efectos de la SES sobre las semillas mediante análisis nutrimentales y pruebas de germinación de semillas.

### **1.3 HIPÓTESIS**

El uso de soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro reduce la presencia de hongos en semillas de jitomate y produce una conversión de metabolitos fúngicos importantes.

## **1.4 JUSTIFICACIÓN**

El jitomate es uno de los productos más importante para México ya que ocupa el primer lugar mundial en exportación de este fruto. También es el cuarto producto con el mayor costo de producción llegando a generar gastos de hasta los 15,735,506,330 pesos durante el 2014. Por estas razones, la producción de jitomate desde que se cultiva hasta su cosecha debe ser vigilada para minimizar las pérdidas de este fruto. La SES representa una estrategia potencial para reducir la contaminación por hongos en semillas y para degradar metabolitos importantes de esos hongos, contribuyendo de esta manera a la producción de frutos de jitomate más inocuos. Además, en nuestro país, actualmente no existen publicaciones que avalen el uso de la SES en el tratamiento para descontaminación de semillas y existe solo una publicación que documenta el efecto de la SES sobre la conversión de aflatoxina.

## **2. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **2.1 Producción de jitomate en México y pérdidas económicas causadas por hongos**

En México la producción de jitomate en el año 2014 representó 15,735,506,330 pesos, obteniendo el cuarto lugar de la producción agrícola en modalidad riego + temporal y en cuanto a semillas de tomate el precio medio rural (PMR) (\$/Ton) fue de 5,600 pesos, representando 784,000 pesos durante el mismo año (SIAP, 2014).

Para satisfacer esta necesidad de producción se requiere cumplir una amplia demanda de semillas las cuales en su almacenaje o en la manipulación para cultivo presentan el riesgo de contaminación fúngica. La infección con hongos representa un posible riesgo de salud pública ya sea al consumir el fruto contaminado o sus subproductos (Al-Askar et al., 2014).

El jitomate es altamente susceptible a la contaminación fúngica que puede ocurrir a raíz del daño a su epicarpio suave y delgado o migrando a través del tejido vascular de la planta desde la raíz. La infección de este fruto con hongos causa decomiso de productos para consumo humano o hace que estos se destinen a otras fuentes de alimento como en el caso de la alimentación animal. Estas pérdidas por hongos impactan en la economía, disminuyendo las ventas de este fruto, ya que además de esta contaminación hay implicaciones de

micotoxinas producidas por algunas especies de estos hongos las cuales generan un problema de salud mundial (Mariutti et al., 2009).

## **2.2 Hongos que afectan al jitomate**

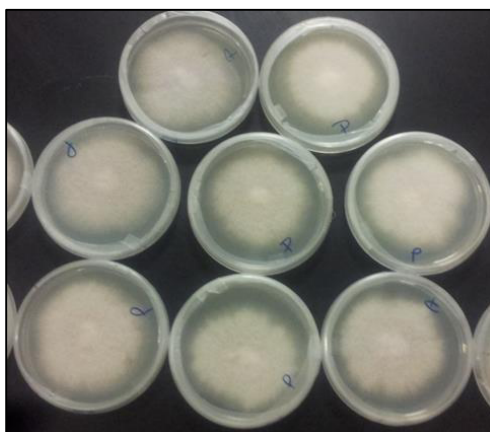
El hongo *F. oxysporum* es uno de los agentes infecciosos más comunes que afectan al jitomate (McGovern, 2015). La transmisión de este hongo se realiza comúnmente a través de las semillas y se disemina a través del sistema vascular, afectando de manera importante los cultivos de jitomate disminuyendo su rendimiento hasta en un 60% y dañando la calidad del producto (Elwakil, 1998; Ascencio-Álvarez, 2008). Se tiene documentado que las especies de *Alternaria* son otros hongos que afectan a las plantas y frutos de jitomate así como también se tienen reportes de infección por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y otras especies de *Fusarium* en jitomate (Van de Perre et al., 2014).

En general, existen reportes que documentan la infección fúngica en semillas de jitomate por los hongos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris maydis*, *Curvularia lunata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. equiseti*, *Cladosporium spp.*, *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Pythium sp.*, *Verticillium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus arrhizus*, *R. stolonifer* y *Sclerotinia sp.* (Nishikawa et al., 2006) resaltando la susceptibilidad de este fruto a infecciones fúngicas.

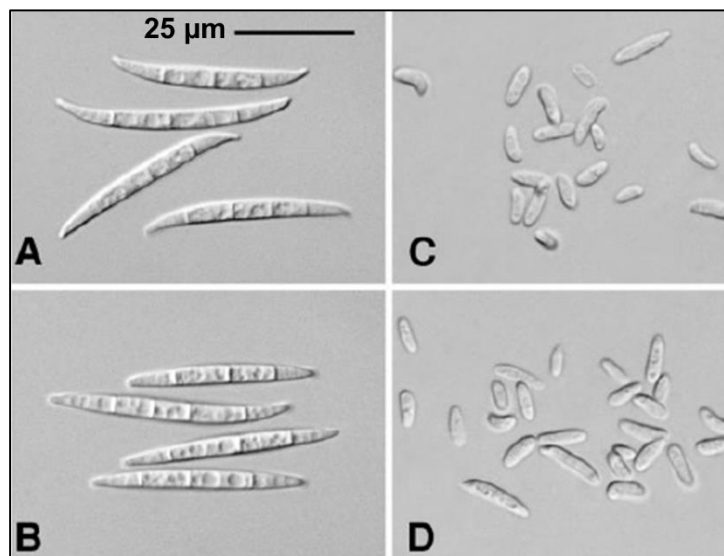


### 2.2.1 *Fusarium oxysporum*

*F. oxysporum* es la especie de *Fusarium* más común, misma que se ha reportado como agente causal de infecciones en más de 100 especies de plantas convirtiéndolo así en la especie de *Fusarium* con mayor importancia económica debido a las pérdidas en producción (Leslie y Summerell, 2006). Es un hongo saprófito facultativo y se ha recuperado de suelos tropicales, desérticos, cultivados y no cultivados, en algas marinas y disperso por insectos (Leslie y Summerell, 2006). Produce colonias de rápido crecimiento con una tasa de 1 cm diario en PDA a 25 °C (**Figura 1**) (De Granada et al., 2001). El hongo produce 3 clases de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas (**Figura 2**). Las microconidias son unicelulares sin septas, de forma oval, elíptica o en forma de riñón, miden de 15-12  $\mu\text{m}$  de largo por 2.5-3.5 $\mu\text{m}$  de ancho. Las macroconidias cuentan con varias células y usualmente 3 septas, de forma recta o ligeramente curva y de pared delgada, miden 27-46  $\mu\text{m}$  de largo por 3.0-4.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las clamidosporas se forman a partir de la condensación del contenido de las hifas y conidias, sus paredes gruesas permiten su resistencia en el suelo y miden de 5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nelson, 1981).



**Figura 1.** Crecimiento de *F. oxysporum* en medio PDA.



**Figura 2.** Clases de esporas de *F. oxysporum*. A-B: Macroconidias; C-D: Microconidias. Adaptado de Leslie, J. F., y Summerell, B. A. (2006).

*F. oxysporum* puede ser transportado por el viento o material de cultivo infectado así como de las semillas de jitomate contaminadas (Productores de Hortalizas, 2006). El signo de infección más común de este patógeno es el marchitamiento de la planta (**Figura 3**). Además, tiene potencial de ser patógeno en mamíferos ya que una cepa de *F. oxysporum* originalmente aislada como patógeno en jitomates pudo causar infección diseminada en ratones inmunosuprimidos (Leslie y Summerell, 2006).



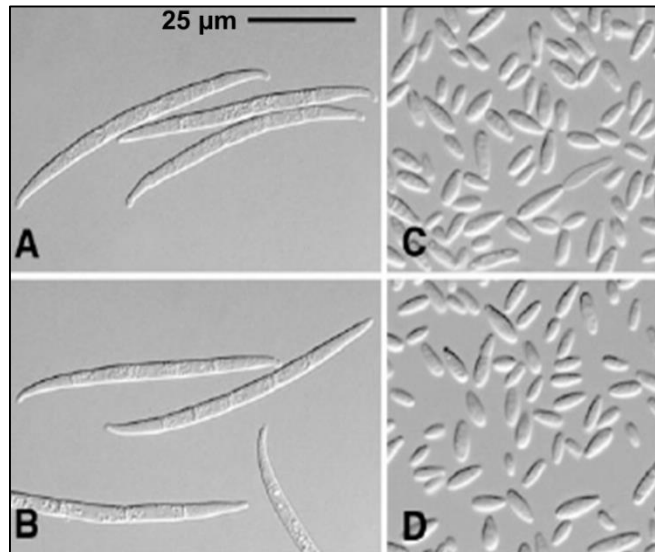
**Figura 3.** Marchitamiento por *Fusarium* en planta de jitomate. Como signo principal de infección se observan hojas amarillentas y marchitamiento de ramas y la planta en general. Tomado de Damicone y Brandenberger (foto de: R.G. Gardner, North Carolina State University).

### **2.2.2 *Fusarium verticillioides***

Este hongo afecta pastos y diversas especies de plantas, principalmente al maíz y se puede encontrar en todo el mundo (Leslie y Summerell, 2006). Es asociado con infección evidente y asintomática de la planta de maíz en todas sus etapas de desarrollo, infectando las raíces, tallos y granos (Bacon et al., 1992; Munkvold et al., 1997).

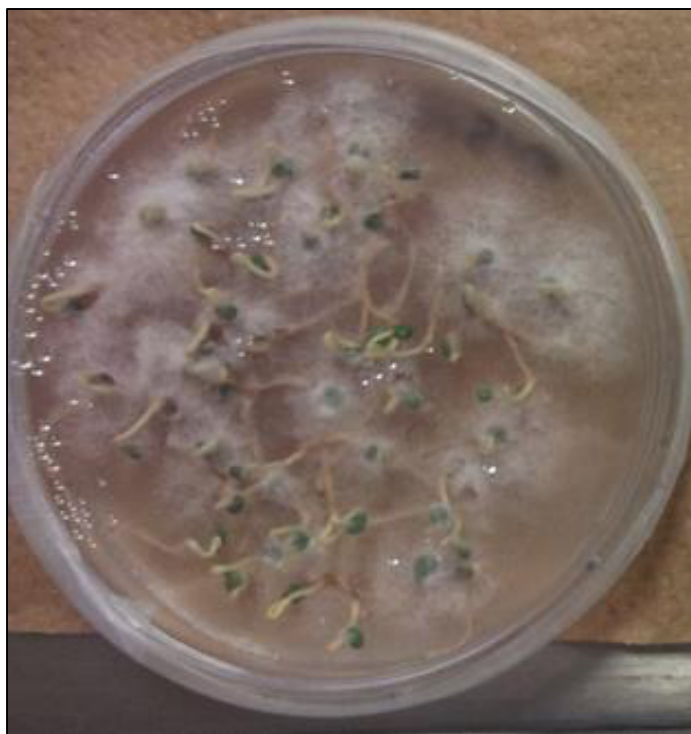
Las microconidias son ovales con base plana sin septas (dimensiones 7–10  $\mu\text{m}$  de largo X 2.5–3.2  $\mu\text{m}$  de ancho), regularmente se encuentran en cadena las cuales pueden ser largas. Este hongo no produce clamidosporas aunque algunas células agrandadas de las hifas suelen confundirse con estas. Las macroconidias (dimensiones 31–58  $\mu\text{m}$  de largo X 2.7–3.6  $\mu\text{m}$  de ancho) son largas y delgadas

con pared delgada casi recta o rectas, presentan de 3 a 5 septas, la célula apical es un poco curva y termina en punta y la basal en forma de pie (**Figura 4**) (Leslie y Summerell, 2006 y Li et al., 2006).



**Figura 4.** Clases de esporas de *F. verticillioides*. A-B: Macroconidias; C-D: Microconidias. Adaptado de Leslie, J.F., y Summerell, B.A. (2006).

En medio PDA el cultivo inicial tiene micelios blancos pero puede desarrollar pigmentos violeta con el tiempo (**Figura 5**) teniendo una variación de no coloración o grisácea naranja hasta un violeta o magenta oscuro pudiendo ser casi negra (Leslie y Summerell, 2006).

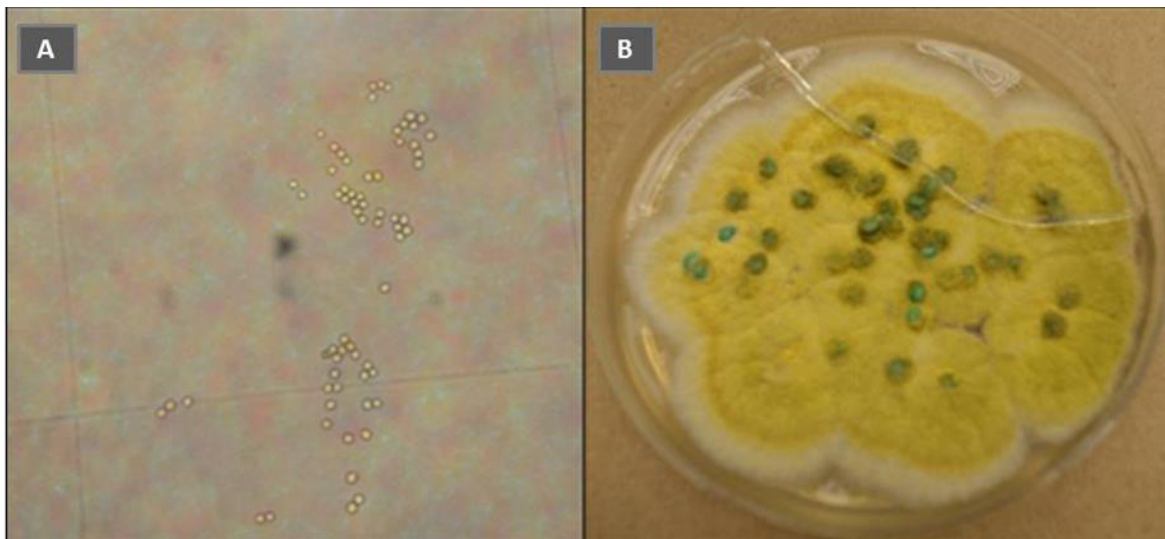


**Figura 5.** Semillas de jitomate contaminadas con *F. verticillioides* en medio PDA.

*F. verticillioides* es la principal fuente de fumonisinas (Leslie y Summerell, 2006), un grupo de micotoxinas asociadas a severas micotoxicosis con efectos en la salud, incluyendo leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en cerdos y cáncer experimental de hígado y riñón en ratas (Howard et al., 2001).

### **2.2.3 *Aspergillus flavus***

Este hongo solo produce un tipo de esporas las cuales son esféricas o subesféricas, lisas o finamente rugosas con un diámetro de 3 a 6  $\mu\text{m}$  (**Figura 6A**), estas esporas se presentan en cadenas las cuales se disponen comúnmente en orientación radial, las colonias de este hongo son entre amarillo verdosas o solo verdes (**Figura 6B**) (Pasqualotto, 2010).



**Figura 6.** A: Características microscópicas de *A. flavus* B: Características macroscópicas de *A. flavus*.

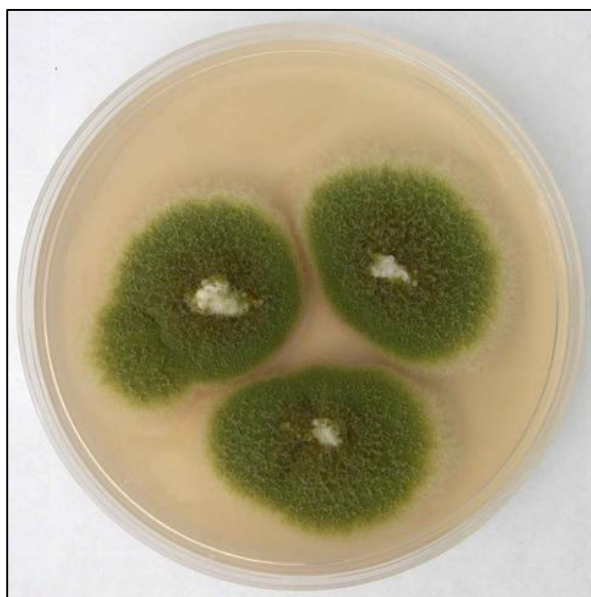
*A. flavus* es un hongo saprofita que afecta cultivos en precosecha y poscosecha y es un patógeno oportunista en animales y humanos provocando aspergilosis con una mayor incidencia en la población inmunocomprometida (Amaike y Keller, 2011). Este hongo infecta diversas semillas y puede reducir los niveles de germinación en algunas (Harmon y Pflieger, 1974). Además de haberse reportado en semillas, también ha sido aislado en especias comercializadas en mercados locales de Qatar (Hammami et al., 2014).

La aflatoxina es una micotoxina importante producida por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, se asocia con hepatotoxicidad, carcinogénesis, teratogénesis e inmunosupresión. La aflatoxina B<sub>1</sub> es particularmente importante ya que es uno de los carcinógenos naturales más potentes caracterizado (Hedayati et al., 2007; Olsen et al., 2008; IARC, 2012).

#### 2.2.4 *Aspergillus parasiticus*

Las especies de *Aspergillus* son las más dominantes entre los hongos que producen deterioro en los alimentos ya que ocurren ampliamente en estos, particularmente en granos que contienen almidón como maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada y mijo (Aziz et al., 2012).

*A. parasiticus* es un hongo que se presenta en suelos en cosecha y poscosecha de diversas especies, se diferencia de *A. flavus* por sus esporas verde oscuro (**Figura 7**) y produce aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Horn, 2009). Su temperatura óptima de crecimiento es 35 °C y se sabe que produce altas concentraciones de aflatoxinas, este hongo se distribuye ampliamente en Estados Unidos, Latinoamérica, Sudáfrica, India y Australia (Schmidt-Heydt et al., 2010).



**Figura 7.** Características macroscópicas de *A. parasiticus*. Tomado de Fungi de Gran Bretaña e Irlanda (2015).

## 2.3 Micotoxinas

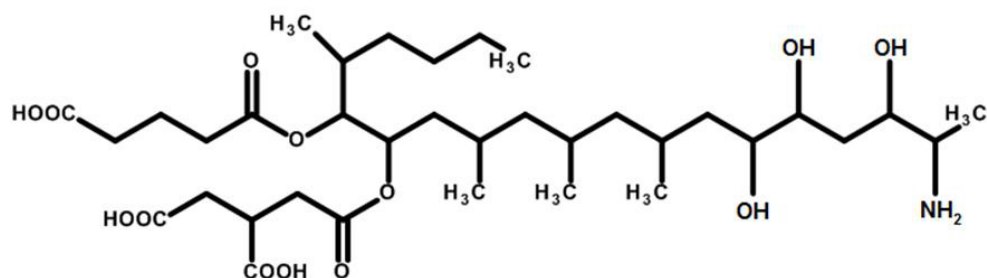
Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por muchos hongos filamentosos las cuales pueden contaminar cultivos y alimentos así como semillas y granos almacenados. Hay una dificultad para definir y clasificar estos compuestos, por lo tanto se clasifican farmacológicamente de acuerdo al metabolito activo secundario producido por cada especie de hongo (Bennett y Klich, 2003). Presentan una gran diversidad en su estructura química, origen biosintético, efecto biológico y el gran número de especies de hongos que las producen. La mayoría de las micotoxinas son inmunosupresoras y algunas carcinógenas, hepatotóxicas, nefrotóxicas y neurotóxicas (Marroquín-Cardona et al., 2014). Las vías de exposición principales son oral, respiratoria y cutánea cuando se tiene contacto directo con el hongo o por manejo de material contaminado.

Entre las principales micotoxinas asociadas a la contaminación de granos están las aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, deoxynivalenol (DON) y zearalenona (ZEN). Las micotoxinas presentes en la mayoría de los granos no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, aunque el proceso de extrusión en la elaboración de croquetas a temperaturas mayores a los 150 °C produce una buena reducción en los niveles de ZEN, reducción moderada en aflatoxinas y de una variable a baja reducción de DON; para obtener un resultado más satisfactorio



De manera general no hay tratamientos para las micotoxicosis solo terapia de soporte como ajustes en la dieta, por lo tanto se deben de tomar medidas para prevenir la exposición a estos metabolitos secundarios.

Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por los hongos *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Son compuestos polares solubles en agua y soluciones acuosas de metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN); la FB<sub>1</sub> (**Figura 8**) es la más abundante de esta familia y se ha asociado al desarrollo de leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en cerdos además de haber sido implicadas en el desarrollo de cáncer de esófago en humanos (Waśkiewicz, Beszterda y Goliński, 2012).

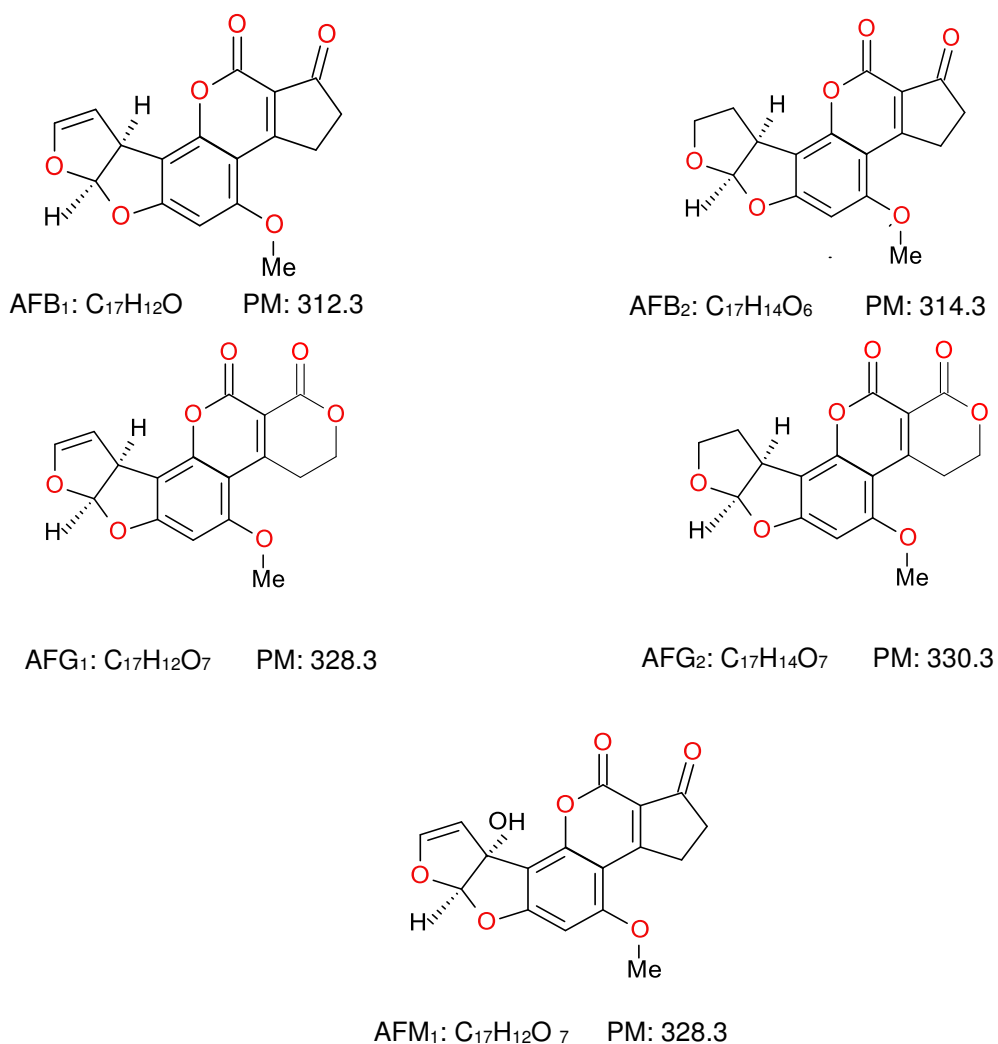


18

Se tiene reportado que la FB<sub>1</sub> es un metabolito fitotóxico en cultivos de jitomate específicamente en las plántulas y sus hojas (Lamprecht et al., 1994). Debido a su clasificación como carcinógeno (IARC, 2002) y a sus efectos como promotor de cáncer, la ocurrencia de hongos productores de FB<sub>1</sub> en productos y subproductos de jitomate es un riesgo a la salud.

### **2.3.2 Aflatoxinas**

Los principales hongos productores de aflatoxinas son *A. flavus* y *A. parasiticus*. Hay cuatro formas importantes de estas toxinas de acuerdo al color de luz que emiten al ser excitadas mediante luz UV: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Siendo B: azul y G: verde. La aflatoxina B<sub>1</sub> es la más tóxica, carcinógena y mutágena (Wong y Hsieh, 1976) y la mezcla de aflatoxinas está clasificada como carcinógeno humano del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 2012). Adicionalmente, la aflatoxina M<sub>1</sub>, un derivado metabólico de la aflatoxina B<sub>1</sub> que se elimina en la leche, también es considerada carcinógeno. **(Figura 9).**



**Figura 9.** Estructura química de las principales aflatoxinas asociadas a problemas de salud. Tomado de Marroquín-Cardona, 2011.

La toxicidad de la aflatoxina se basa en la conversión por las enzimas citocromo P450 en un compuesto reactivo, el epóxido 8,9 el cual se une a la guanina del ADN en la posición N<sup>7</sup> provocando transversiones GC-TA por lo que existe una correlación entre la exposición a aflatoxina y el número de aductos de DNA *in vivo* (Bennett y Kilch, 2003).

La aflatoxina B<sub>1</sub> se ha encontrado en muestras de jitomate en el mercado así como en otros vegetales y condimentos (Hacıbekiroğlu y Kolak, 2013).

## **2.4 Estrategias para reducir la contaminación fúngica en semillas**

Existen diferentes estrategias para reducir la presencia de hongos en semillas, dentro de estas se incluyen el uso de ozono, irradiación gama y el uso de fungicidas (Gómez-López, 2012; Aziz et al., 1997, 2005, 2007; Gharib y Aziz, 1995; Refai et al., 2003; Song et al., 2004).

El ozono es efectivo contra un amplio rango de microorganismos patógenos actuando mayormente por dos vías, ya sea de manera directa por el ozono molecular o de manera indirecta mediante los radicales libres que se forman como resultado de la descomposición del ozono (Gómez-López, 2012). El ozono se genera en agua y los tratamientos para descontaminar frutos y semillas se realizan por inmersión. La efectividad del ozono depende de muchos factores entre ellos depende del fruto, semilla o vegetal tratado, el microorganismo a atacar, el nivel de inoculación inicial, las condiciones de incubación y el tiempo de exposición inicial (Gómez-López, 2012). Es un tratamiento que no interfiere con los parámetros nutricionales de los frutos al emplearse en los niveles adecuados. La vida media del ozono en agua es de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente (Graham, 1997).

La irradiación gamma a dosis adecuadas es otro tratamiento efectivo y seguro de acuerdo a estudios en los que se documenta que puede usarse como un método para el control de hongos en alimentos, particularmente de *Fusarium* en semillas, así como para el control de fumonisina (Aziz et al., 1997, 2005, 2007; Gharib y Aziz, 1995; Refai et al., 2003). Sin embargo, la irradiación gamma en altas dosis en semillas pueden producir distintas alteraciones a nivel celular al ser cultivadas (Franco et al., 2015) y reducir los niveles de germinación de las semillas tratadas (Ramakrishna et al., 1991).

#### **2.4.1 Fungicidas**

Algunos de los fungicidas empleados comúnmente en el control de *F. oxysporum* en jitomate incluyen procloraz, carbendazim, tiram, tolclofos-metil, himexazol, azoxistrobin y carboxin (Song et al., 2004). El procloraz es un imidazol no sistémico, inhibidor de la biosíntesis de ergosterol. Su nombre químico de acuerdo a la IUPAC es N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]imidazol-1-carboxamida (FAO, 2009). El procloraz induce los niveles de citocromo P-450 hepático e intestinal y la actividad de monooxigenasa en la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), gallinas (*Gallus gallus*) y faisanes (*Phasianus colchicus*) (Rivière et al., 1985). Se ha demostrado que bloquea los receptores de andrógenos y afecta la esteroidogénesis fetal en ratas Wistar, reduciendo los niveles de testosterona en plasma e incrementando la progesterona causando la feminización en los machos (Vinggaard et al., 2005).

El carbendazim, (metil 1H-benzimidazol-2-yl carbamato) (IUPAC) es un fungicida sistémico de amplio espectro el cual controla diversos patógenos y se ha demostrado que afecta tejidos de hígado y riñón en ratas así como también produce cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos de estas (Selmanoğlu et al., 2001), en peces cebra induce estrés oxidativo, apoptosis, inmunotoxicidad y es un disruptor endocrino en el desarrollo larvario (Jiang et al., 2015).

Tiram (disulfuro de tetrametil carbamilo) es ampliamente utilizado en la agricultura como un fungicida para tratar semillas. Sin embargo, estudios revelan que reduce los niveles de glutatión intracelular produciendo estrés oxidativo que lleva a la muerte celular en fibroblastos humanos demostrando así su citotoxicidad (Cereser et al., 2001). Además su toxicidad crónica se ha demostrado en ratas Wistar las cuales presentaron retraso en el crecimiento y baja ingesta de alimento y las hembras presentaron una anemia evidente y en perros beagle la toxicidad de este compuesto se manifestó como náuseas, vómito, salivación, desarrollo de convulsiones clónicas así como falla hepática (Maita et al., 1991).

Tolclofos-metil (o-2,6-dicloro-p-tolil o,o-dimetil fosforotioato) (IUPAC) es un fungicida organofosforado que actúa por inhibición de la biosíntesis de los fosfolípidos, impidiendo la germinación de las esporas y el crecimiento de los micelios (FAO 1994). En un estudio este fungicida presentó actividad estrógena en una línea celular de rata (Manabe et al., 2006).

Himexazol (5-metilisoxazol-3-ol) (IUPAC) es un fungicida sistémico el cual también es empleado para controlar enfermedades provocadas por *Fusarium* en suelos, al entrar en la planta es rápidamente transformado en glucósidos, el O-glucósido tiene función tóxica como resultado de la interferencia con la síntesis de ARN y ADN. (Roberts y Hutson, 1999). Es suficientemente volátil por lo tanto puede ser emitido en la atmósfera a menos que sea cubierto o incorporado en los suelos (Atkinson y Arey, 2003).

Azoxistrobin (Metil (E)-2-{2 [6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi] fenil}-3-metoxiacrilato) (IUPAC) pertenece a la clase de las estrobilurinas, la cual es una de las más importantes que actúa como fungicida en la agricultura a nivel mundial encargándose de inhibir la respiración mitocondrial de hongos patógenos (Bartlett et al., 2002). Se ha establecido que este fungicida es tóxico en agua así como en invertebrados marinos y peces (US EPA, 1997).

Carboxin (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxati-in-3-carboxanilida) (IUPAC) se encarga de prevenir la respiración de la mitocondria en hongos al inhibir la actividad respiratoria del complejo II o metabolismo del succinato (Ulrich y Mathre, 1972). Las mutaciones en los genes que codifican las subunidades del complejo succinato deshidrogenasa brindan resistencia a varios organismos (Ito et al., 2004).

### 2.4.2 Soluciones Electrolizadas de Superoxidación

Una alternativa a los compuestos germicidas altamente tóxicos usados para tratar semillas de jitomate es el uso de soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) que se usan frecuentemente en alimentos para su desinfección. La SES es creada mediante electrólisis de cloruro de sodio (NaCl) que es disuelto en soluciones acuosas las cuales pasan por una cámara de electrólisis que permiten la generación de cloro libre disponible como HOCl, HCl y NaOH (Gómez-López, 2012). Cabe mencionar que en este proceso de producción también se puede emplear KCl y  $MgCl_2$  (Buck et al., 2002).

En el proceso de generación, de acuerdo a su pH, la SES puede ser ácida, alcalina o neutra; para generarla con pH neutro se puede mezclar SES ácida y alcalina (Deza et al., 2003; Rico et al., 2008) no usando una membrana de separación para dividir el producto de la celda electrolítica (Venczel et al., 1997) u obteniendo la SES que se genera del lado del ánodo de la celda (Guentzel et al., 2008).

Al producirse la SES por electrólisis y no emplear químicos en el agua y solo añadir NaCl puede revertirse nuevamente a agua después de su uso (Bonde et al., 1999) por lo tanto es segura para el medio ambiente, económica y accesible (Venczel et al., 1997).

Hay varios equipos en el mercado capaces de producir la SES, siendo Japón el principal país fabricante de la tecnología junto con China y Estados

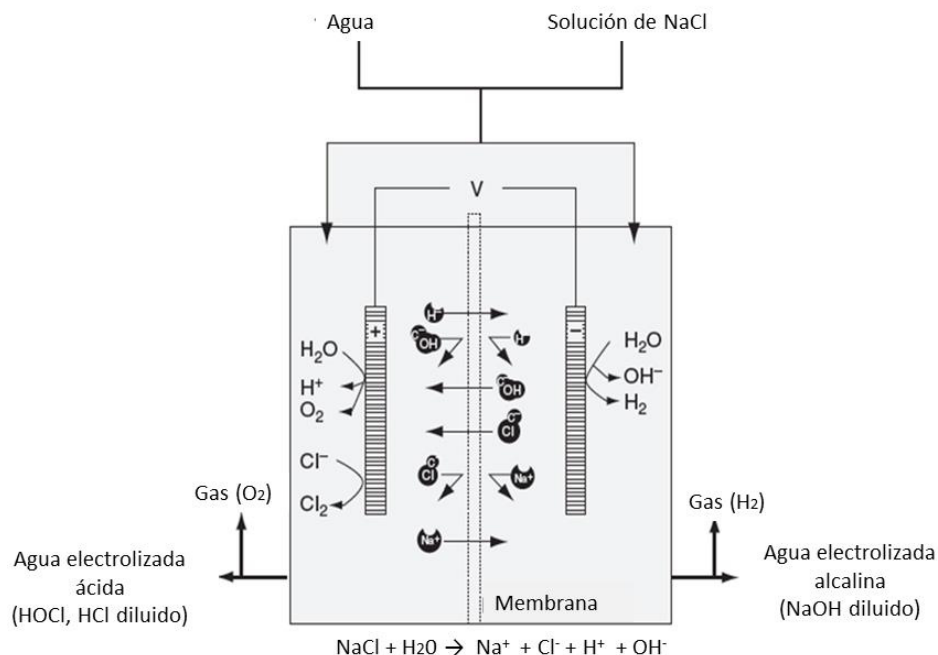


Unidos que se encuentran en segundo y tercer lugar. De manera general los equipos generadores de la SES se dividen en dos, los que cuentan con septum o membrana en la celda de electrólisis que producen SES a pH 2 y 3; y los equipos que no cuentan con la membrana y producen SES con pH neutro. En estos últimos equipos, el HCl formado en el lado del ánodo neutraliza el NaOH del lado del cátodo (Hirano y Ueda, 1997). De acuerdo a Al-Haq y Sugiyama (2004), el equipo más reportado en publicaciones es ROX-20TA (**Figura 10**) fabricado por Hoshizaki Electric Inc., Toyoake Aichi, Japón.



**Figura 10.** Generador de SES ROX-20TA más comúnmente empleado (Al-Haq et al. 2005)

A manera de esquema, el cloro es generado en el ánodo (agua oxidada o ácida) y el hidrógeno ( $H_2$ ) en el cátodo (agua reducida o alcalina) (**Figura 11**).

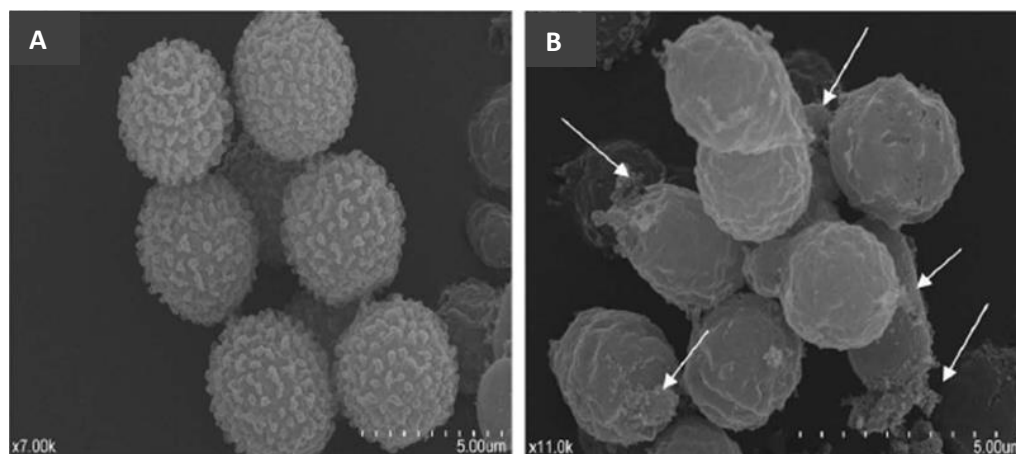


**Figura 11.** Esquema del generador de SES y los compuestos producidos. Adaptado de Al-Haq et al., 2005.

El Cl<sub>2</sub> reacciona con el agua para formar HOCl y HCl. Estudios sugieren que el HOCl (cloro no dissociado) penetra en las membranas celulares microbianas ejerciendo subsecuentemente su acción antimicrobiana mediante la oxidación de sistemas metabólicos (Albrich et al., 1986; Barrette et al., 1989; Hurst et al., 1991).

La concentración de reactivos de cloro en la SES es influenciada por el amperaje del generador de SES (Park et al., 2001). Se tiene documentado que la cantidad de HOCl producido durante la electrólisis se relaciona positivamente con la cantidad de NaCl añadido. Sin embargo la producción de la SES se puede modificar para reducir la presencia de HOCl y aun mantener su efectividad para la inactivación microbiana y reducir así los niveles de agua clorada (Kim et al., 2000; Len et al., 2000).

La cantidad de cloro disponible, el potencial de oxidación reducción y el pH en la SES no tienen un papel relevante en la reducción del crecimiento de agentes contaminantes como los hongos, el factor fungicida principal de este tipo de soluciones son las concentraciones de radicales  $\cdot\text{OH}$  que se originan en mayor medida en SES de pH neutro. De esta manera, las ROS como el  $\cdot\text{OH}$  y otros radicales son los que están involucrados en el proceso de desinfección al destruir las estructuras celulares de las esporas (**Figura 12**), produciendo un aumento en la permeabilidad que causa liberación de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Xiong et al., 2010).



**Figura 12.** Espora de *A. flavus*. A: Espora normal. B: Espora tratada con SES de pH neutro. Las flechas muestran encogimiento y agrietamiento de paredes celulares causando incremento de la permeabilidad iónica. Tomado de Xiong et al., 2010.

La capacidad de desinfección de la SES se ha probado en diversas semillas (Lixin et al., 2010; Yoshida et al., 2003; Zhang et al., 2011) aunque los estudios en los que se ha evaluado SES sobre semillas de tomate se enfocan particularmente en su efecto contra bacterias (Bari et al., 2003; Park et al., 2009).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

Para los experimentos de efectividad de la SES sobre semillas se utilizaron semillas de jitomate, variedad El Cid F1 (Harris Moran) adquiridas de Ahern Internacional de México SA de CV (Celaya, Guanajuato, México). Las semillas venían en empaques sellados estériles. Las semillas fueron colocadas en sacos de nylon poroso en grupos de 50 semillas en condiciones asépticas y almacenadas para los experimentos subsecuentes.

Las cepas de *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. parasiticus* usadas para la inoculación de semillas, fueron obtenidas a través de una donación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La SES de pH neutro ( $7 \pm 0.05$ ) a 10, 40 y 60 mg/L de cloro activo fue proporcionada por Esteripharma S.A. de C.V. Los niveles de pH y cloro de la SES fueron medidos antes y después de su uso en los experimentos con un potenciómetro (Thermo Scientific Orion) y un fotómetro (Hannah Instruments HI 96771), respectivamente. El medio para crecimiento de estas cepas de hongos fue en PDA para *Fusarium* y SDA (Bioxon Becton Dickinson, México) para *Aspergillus*. Para preparar las suspensiones de esporas usadas para infectar las semillas se utilizó polisorbato 80 NF grado reactivo al 0.1% (Comercializadora de Productos Químicos TANY). Esta concentración de polisorbato es menor a la que ha sido reportada por otros autores para conteo de esporas de *Aspergillus* (Xiong et al., 2010).

Para las pruebas de conversión de los metabolitos se empleó AFB<sub>1</sub> y FB<sub>1</sub> (Sigma Aldrich). El MeOH y ACN usados para estos análisis fueron grado HPLC (Fisher Scientific), el agua empleada para los experimentos fue ultrapura de 18.2 MΩ·cm (megaohms) filtrada en equipo Simplicity® (Merk Millipore Co). Para la calibración del fluorómetro (VICAM SERIES-4EX) se utilizaron los estándares de calibración (FumoniTest VICAM) y para obtener la fluorescencia adecuada para la lectura se empleó el revelador A y B (Fumoni Test VICAM).

Para las pruebas de germinación se usó polietilenglicol (PEG 8000, Fisher Scientific). Todos los demás reactivos usados fueron grado ACS.

### **3.2 Inoculación de semillas y aplicación de la SES**

Para los estudios de efectividad, los hongos *F. oxysporum* y *F. verticillioides* se cultivaron en PDA por 14 días a temperatura ambiente (25°C), mientras que los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* se crecieron en medio SAB a una temperatura de 35°C por 14 días. Las placas para cada hongo fueron sembradas por estría a partir de tubos que contenían muestra del hongo en agua bidestilada estéril. Una vez que se obtuvo en las placas una gran proliferación del hongo, los agares fueron lavados con polisorbato 80 [0.1%] para coleccionar las esporas. Se prepararon suspensiones de esporas conteniendo entre  $2-2.5 \times 10^6$  esporas/mL de cada hongo cuantificando con cámara de Neubauer de 0.100mm de profundidad (ISO LAB) (**Figura 13**). Los grupos de 50 semillas cada uno (colocados en sacos de nylon poroso el cual fue puesto previo a su uso en luz UV para asegurar la

inocuidad del material) se sumergieron en las soluciones de esporas respectivas (500mL de cada solución) durante 20 min. Las semillas inoculadas fueron sumergidas posteriormente en la SES a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre durante 5, 10, 15 y 20 min. Estas condiciones experimentales no exceden los límites permisibles de cloro en la industria alimenticia (Gómez-López, 2012) e incluyen los tiempos de tratamiento usados en investigaciones similares (Buck et al., 2002). Los valores de pH y cloro libre de la SES 10, SES 40 y SES 60 donde fueron inmersos los sacos se midieron antes y después de cada experimento con las cuatro especies de hongos a los cuatro distintos tiempos de inmersión en la SES con un potenciómetro y un fotómetro, respectivamente. Como controles se usaron agua ultrapura e hipoclorito de sodio (65000 mg/L de cloro activo). Cada tratamiento consistió de 4 réplicas. Después, las semillas se incubaron por 7 días en cajas de Petri de policarbonato con PDA para *Fusarium* (Audenaert et al., 2012) a 25 °C y por 3 días en SDA para *Aspergillus* a 35 °C ( Okun et al., 2015) ya que este periodo genera una proliferación adecuada del hongo para aislamiento de esporas. Al completar la incubación, las esporas fueron colectadas de los agares usando polisorbato 80 [0.1%] para proceder a su cuantificación.

### **3.3 Conteo de esporas**

Para determinar la producción de esporas en las pacas con semillas control y expuestas a los tratamientos (sección 3.2), se realizó la colecta de esporas después de los 7 días para *Fusarium* y 3 días para *Aspergillus* utilizando

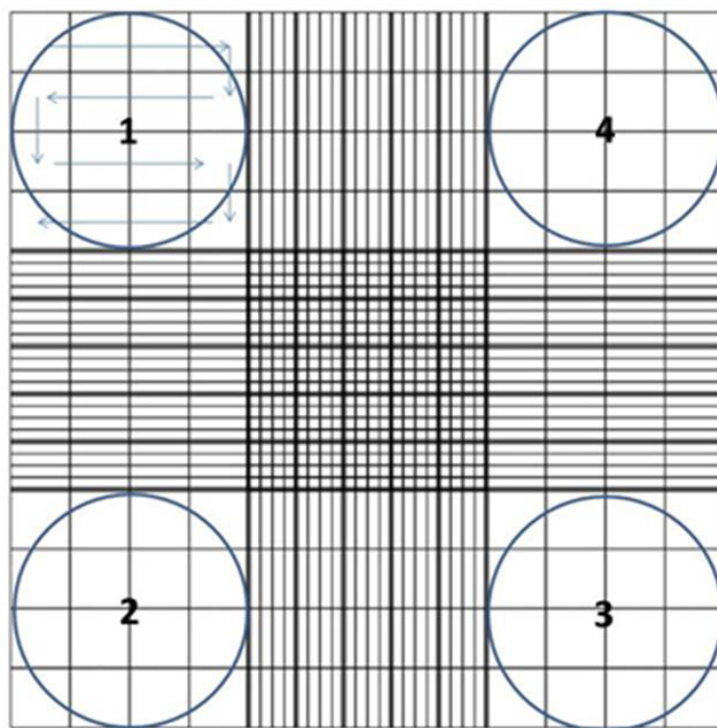
polisorbato 80 [0.1%] agitando suavemente. Las esporas se cuantificaron en la suspensión preparada usando cámaras de Neubauer (**Figura 13**) determinando las esporas por mL. Las lecturas se realizaron bajo observación en microscopio a 40x en los cuadrantes de 1 x 1 x 0.1 mm (factor 1 x 10<sup>4</sup>), el resultado se expresó en número de esporas por mL.

Se cuantificaron las esporas presentes en los cuadrantes usando la siguiente formula:  $No. de esporas / mL = \frac{Esporas\ totales \times Factor\ de\ Cámara\ (10,000)}{Número\ de\ cuadros \times dilución}$

Los conteos de esporas se realizaron en los 16 cuadros de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer empezando por el primer cuadrante de la parte superior izquierda como se indica en la **figura 14**.



**Figura 13.** Cámara de Neubauer ISOLAB.



**Figura 14.** Cuadrantes de cámara Neubauer. Para el conteo se tomaron en cuenta las esporas comprendidas en los 16 cuadros de cada uno de los 4 cuadrantes como se señalan las flechas en el círculo número 1.

### 3.4 Pruebas de germinación

Las pruebas de germinación se realizaron con cuatro réplicas de 50 semillas embebidas en dos capas de papel filtro en placas de Petri de 5 cm de diámetro a las que se les añadió 1.5 mL de la solución de germinación seguido de incubación a 25 °C. Los controles y tratamientos incluyeron agua destilada y cloro comercial; el tratamiento con PEG 8000 al 5 %, y el tratamiento con PEG 8000 al 10 % y tres tratamientos con SES a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre. Las soluciones de PEG 8000 (5% y 10%) se prepararon para garantizar un potencial osmótico durante las pruebas de germinación. Cada 24 h se añadió la solución de



germinación (ésta fue cada uno de los tratamientos y controles) para mantener el potencial hídrico constante. Las cajas Petri con las semillas se colocaron en bolsas de plástico selladas y se incubaron a 25 °C durante 4 días en la oscuridad y su germinación se observó periódicamente. Se realizaron cuatro repeticiones de 50 semillas de cada tratamiento, incluyendo el control, con un total de 7 tratamientos de 50 semillas = 350 x 4 repeticiones = 1400 semillas evaluadas.

### **3.5 Efectos de la SES sobre parámetros nutricionales**

La inocuidad de las SES sobre las semillas se evaluó también mediante análisis proximales para determinar los parámetros nutrimentales de estas. Las semillas de jitomate fueron colectadas de los frutos de jitomate variedad saladette. Las semillas fueron obtenidas a partir de 16 kg de jitomate con una espátula. Después de colectarse, estas fueron dejadas en fermentación en un matraz de vidrio por 3 días en oscuridad. Este proceso de fermentación permitió degradar el material gelatinoso que rodea a la semillas y poderlas separar de los tejidos residuales del fruto. Posterior a este proceso, las semillas fueron lavadas con abundante agua y puestas a secar a 65 °C dentro de un horno de aire forzado por 24 h. Tras el secado, las semillas fueron molidas en una licuadora de vidrio 7010S (Waring Commercial) a velocidad alta y pasadas a través de una malla Fisherbrand® tamiz 20 con una porosidad de 850 µm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los métodos para los análisis proximales se basaron en los reportados por la AOAC (AOAC, 2000). La materia seca fue calculada al medir la diferencia

en peso húmedo menos el peso seco en el horno a 100 °C. La proteína fue determinada con el método Kjeldahl empleando sulfato de cobre pentahidratado como catalizador. Brevemente, 0.2 g de muestra fueron digeridos con 5 mL de ácido sulfúrico y 3 g de mezcla de catalizador (3:97 sulfato de cobre pentahidratado: sulfato de potasio) y calentada a 300 °C. Después se añadieron 20 mL de agua bidestilada al tubo. La muestra fue destilada en una unidad para microdestilación (Labconco, MO, USA) y titulada colorimétricamente con 0.1N HCl. La ceniza total fue determinada con el método de incineración en horno. Los lípidos crudos fueron extraídos con un extractor ANKOM<sup>XT10</sup> (ANKOM, Macedon NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fibra cruda se determinó con un analizador automatizado de fibra ANKOM 200 (ANKOM, Macedon NY) de acuerdo a métodos oficiales de la AOAC.

### **3.6 Efecto de la SES sobre las micotoxinas**

Los cambios de las propiedades moleculares para AFB<sub>1</sub> fueron documentados con cromatografía líquida de ultra desempeño UPLC (ACQUITY UPLC H-Class © WATERS) y verificados con espectrofotómetro de masas en colaboración con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en el campus de la Universidad Texas A&M. Se prepararon soluciones de AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL y 100 ng/mL y se evaluó la SES de 60 mg/L de cloro libre. Los niveles de AFB<sub>1</sub> usados incluyen rangos de contaminación frecuentes. Para la cromatografía líquida se evaluó en una relación 1:1, la SES a 60 mg/L de cloro

libre con el estándar de AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL y a 100 ng/mL por separado. Las soluciones se colocaron en viales ámbar y se dejaron actuar con la SES durante 20 min para proceder a su análisis con un tiempo de corrida de 15 min empleando un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 429 nm, un flujo de 0.2 mL por min y un volumen de inyección de 20 µL. La columna utilizada fue una AQUITY UPLC BEH C18 fase reversa (2.1 × 100 mm, 1.7 µm). Se inyectó ACN grado HPLC para asegurar que no existan residuos de otro compuesto, seguido de inyección de MeOH grado HPLC, inyectando después la SES a 60 mg/L, e inmediatamente después la mezcla de SES a 60 mg/L + AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL, SES 60 mg/L + 100 ng/mL de AFB<sub>1</sub>, la AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL y la AFB<sub>1</sub> a 100 ng/mL. La fase móvil consistió de 640 mL de H<sub>2</sub>O, 180 mL de MeOH y 180 mL de ACN grado HPLC.

En las pruebas con espectrometría de masas se prepararon 4 viales: 1) AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL, 2) AFB<sub>1</sub> a 100 ng/mL, 3) 1:1 SES 60 + AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL y 4) 1:1 SES 60 + AFB<sub>1</sub> a 100 ng/mL. Los viales 3 y 4 fueron expuestos a la SES de 60 mg/L de cloro libre durante 20 min y después se secaron en un evaporador de nitrógeno a temperatura ambiente para posteriormente disolverse en 500 µL de ACN al 80% + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). La matriz empleada fue ácido α-ciano-4hidroxicinámico para ionización directa. El equipo de MS fue un MALDI-TOF (Shimadzu Axima Assurance) con un rango de repetición variable de 50 Hertz con láser de nitrógeno.

Para FB<sub>1</sub> se verificó el efecto de la SES en la reducción de detección de esta toxina mediante fluorometría usando un fluorómetro (VICAM SERIES-4EX).

Se prepararon soluciones de FB<sub>1</sub> (Sigma Aldrich) suspendida en MeOH a 4 mg/L y se evaluó el efecto de la SES para reducir los niveles de FB<sub>1</sub>. Se colocaron en tubos de ensayo, las soluciones de FB<sub>1</sub> (0.5 mL) que fueron desafiadas con la SES a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre (0.5 mL) de cada una por separado durante 20 min. Cada análisis se realizó por triplicado. Para su lectura con el fluorómetro, las soluciones incubadas de SES y FB<sub>1</sub> se mezclaron con 1 mL de revelador (Fumoni Test VICAM). Antes de la lectura, el equipo de fluorometría fue calibrado con los reactivos VICAM correspondientes. Teniendo así:

- 1) (1 tubo) 1 mL de MeOH + 1 mL de revelador como control negativo.
- 2) (1 tubo) FB<sub>1</sub> a 4 mg/L = 0.5 mL de FB<sub>1</sub> a 8 mg/L + 0.5 mL de H<sub>2</sub>O HPLC + 1 mL de revelador como control positivo.
- 3) (3 tubos) FB<sub>1</sub> + SES a 10 mg/L de cloro libre = 0.5 mL de FB<sub>1</sub> a 8 mg/L + 0.5 mL de SES 10 + 1 mL de revelador.
- 4) (3 tubos) FB<sub>1</sub> + SES a 40 mg/L de cloro libre = 0.5 mL de FB<sub>1</sub> a 8 mg/L + 0.5 mL de SES 40 + 1 mL de revelador.
- 5) (3 tubos) FB<sub>1</sub> + SES a 60 mg/L de cloro libre = 0.5 mL de FB<sub>1</sub> a 8 mg/L + 0.5 mL de SES 60 + 1 mL de revelador.

### **3.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las pruebas de efectividad e inocuidad fueron analizados con métodos no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, la prueba T-test se utilizó para comparar el pH y la prueba Wilcoxon para analizar los parámetros de cloro activo, previos y posteriores a los experimentos de la efectividad de la SES. T-test se empleó para comparar el análisis proximal de las semillas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estabilidad de la SES

Las medias de pH y cloro activo de la SES durante los experimentos de efectividad (antes y después) se muestran en la **Tabla 1**. Estas medias fueron calculadas de todas las lecturas realizadas a la SES independientemente del hongo a tratar y el tiempo. Estos parámetros mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) antes y después en la eficacia de estos experimentos. En general hubo una tendencia en la reducción de los valores de pH y cloro activo posterior a su aplicación sugiriendo que la eficacia de la SES puede ser afectada por la exposición a materia orgánica como sucede con otros agentes a base de cloro.

**Tabla 1. Niveles de cloro libre y pH en la SES antes y después de la descontaminación de las semillas de jitomate**

SES	Cloro libre (antes)	Cloro libre (después)	pH (antes)	pH (después)
10 mg/L	11.2 $\pm$ 0.27	9.4 $\pm$ 0.42*	7.25 $\pm$ 0.04	7.12 $\pm$ 0.04*
40 mg/L	40.6 $\pm$ 0.30	40.4 $\pm$ 0.94	7.1 $\pm$ 0.02	7.0 $\pm$ 0.02*
60 mg/L	52.2 $\pm$ 0.97	51.5 $\pm$ 1.25	7.2 $\pm$ 0.01	7.1 $\pm$ 0.43*

\*Los valores de cloro activo y pH son medias y el error estándar del total de las mediciones independientemente del tipo de hongo y el tiempo. Se documentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de pH empleando la prueba T-test. El \* denota diferencias significativas entre el antes y después para cada medición. Lo mismo ocurrió para las medias de cloro libre ( $p \leq 0.05$ ) utilizando la prueba Wilcoxon.

## 4.2 Resultados de las pruebas de efectividad de la SES

Se observó que la concentración más efectiva para reducir el crecimiento de las cuatro cepas de hongos fue la SES a 60 mg/L de cloro libre (**Tabla 2**), registrándose niveles de reducción de esporas/mL de hasta 64% para *F. oxysporum*, hasta un 76% para *F. verticillioides*, un 98% para *A. flavus*, y de un 94% para *A. parasiticus* (**Figuras 15-18**). El tratamiento con agua fue el control positivo en el cual se basan las gráficas del porcentaje de reducción en la producción de esporas de las cuatro especies de hongos, dicho tratamiento estaría en la base del eje  $x$  al 0% (0% de reducción) por tal motivo no se incluye en las figuras, así mismo la reducción de la producción de esporas que se expresa de manera negativa en las gráficas representa un incremento en el conteo de esporas de estos hongos con base en el tratamiento con agua.

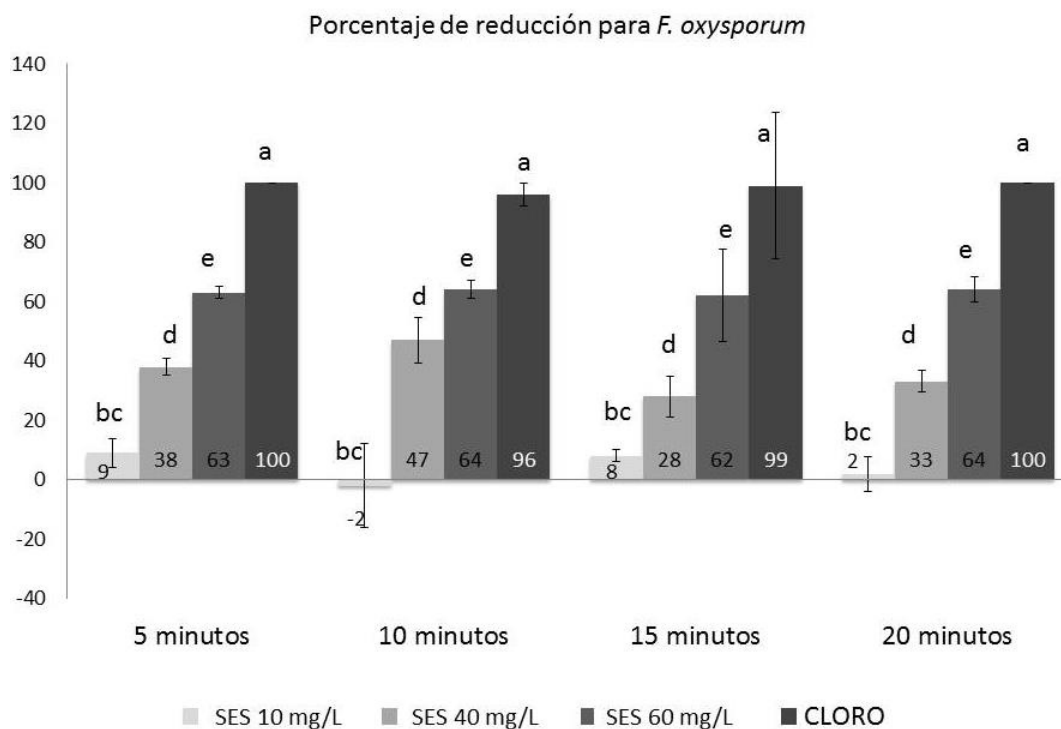
Se documentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la mayoría de los tratamientos de SES para los diferentes hongos (**Tabla 2**). El tiempo de exposición a las SES mostró diferencia significativa para *A. parasiticus* ( $p \leq 0.05$ ) mientras que para los otros hongos no mostró efecto.

**Tabla 2. Efectividad de la SES sobre *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. parasiticus***

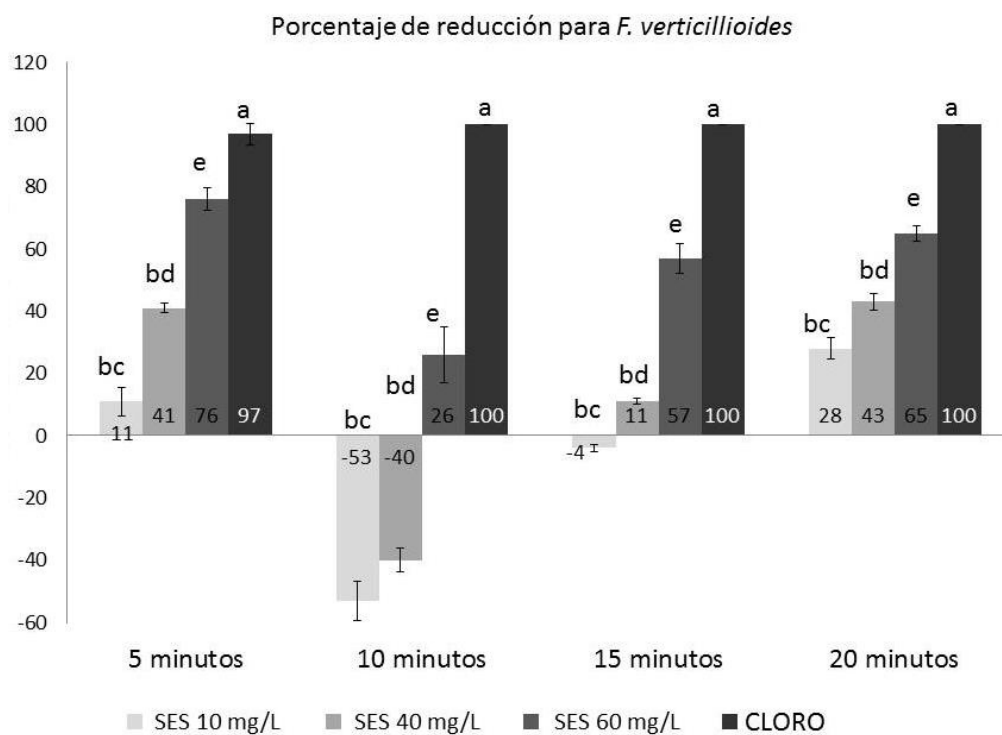
TIEMPO (min)	CLORO 6.5%	AGUA	SES 10	SES 40	SES 60
<b><i>F. oxysporum</i></b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>bc</b>	<b>d</b>	<b>e</b>
5	0	83.5 (76.0-98.8) x10 <sup>5</sup>	76.4 (69.6-88.8) x10 <sup>5</sup>	52.3 (48.9-59.2) x10 <sup>5</sup>	32.9 (26.9-34.5) x10 <sup>5</sup>
10	0.0(0.0-10.6) x10 <sup>5</sup>	66.0 (55.9-81.0) x10 <sup>5</sup>	60.9 (55.9-96.6) x10 <sup>5</sup>	32.0 (28.5-51.3) x10 <sup>5</sup>	22.9 (20.6-30.1) x10 <sup>5</sup>
15	0.0(0.0-2.1) x10 <sup>5</sup>	76.4 (58.0-93.6) x10 <sup>5</sup>	68.5 (63.5-79.9) x10 <sup>5</sup>	54.0 (49.7-62.0) x10 <sup>5</sup>	27.3 (24.7-35.7) x10 <sup>5</sup>
20	0	79.1 (55.5-81.1) x10 <sup>5</sup>	74.6(60.0-79.9) x10 <sup>5</sup>	49.1(44.1-55.7) x10 <sup>5</sup>	24.2(21.8-35.3) x10 <sup>5</sup>
<b><i>F. verticillioides</i></b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>bc</b>	<b>bd</b>	<b>e</b>
5	0.0(0.0-21.6) x10 <sup>5</sup>	159.2(139.5-166.1) x10 <sup>5</sup>	140.1(120.1-153.8) x10 <sup>5</sup>	89.3(87.9-99.0) x10 <sup>5</sup>	37.2(24.0-49.2) x10 <sup>5</sup>
10	0	54.1(48.2-62.4) x10 <sup>5</sup>	81.7(78.1-93.7) x10 <sup>5</sup>	75.4(72.6-82.4) x10 <sup>5</sup>	43.7(26.5-48.5) x10 <sup>5</sup>
15	0	86.8(70.0-115.1) x10 <sup>5</sup>	93.1(91.5-95.9) x10 <sup>5</sup>	80.8(77.9-81.4) x10 <sup>5</sup>	42.0(25.6-44.3) x10 <sup>5</sup>
20	0	117.5(101.5-123.7) x10 <sup>5</sup>	80.0(76.3-93.8) x10 <sup>5</sup>	67.7(56.9-72.0) x10 <sup>5</sup>	40.0(34.7-45.8) x10 <sup>5</sup>
<b><i>A. flavus</i></b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>bc</b>	<b>d</b>	<b>e</b>
5	0	36.1 (21.4-41.5) x10 <sup>5</sup>	19.4 (13.9-26.8) x10 <sup>5</sup>	8.43 (5.8-10.0) x10 <sup>5</sup>	1.1 (0.4-9.1) x10 <sup>5</sup>
10	0	40.4 (30.9-92.0) x10 <sup>5</sup>	21.9 (12.2-36.1) x10 <sup>5</sup>	2.8 (2.3-4.0) x10 <sup>5</sup>	1.0 (0.7-1.3) x10 <sup>5</sup>
15	0	16.7 (7.6-28.4) x10 <sup>5</sup>	18.4 (7.4-25.9) x10 <sup>5</sup>	7.1 (4.1-9.1) x10 <sup>5</sup>	1.8 (1.5-7.2) x10 <sup>5</sup>
20	0	22.7 (12.8 -45.9) x10 <sup>5</sup>	36.0 (20.6-51.7) x10 <sup>5</sup>	11.4 (7.8-16.0) x10 <sup>5</sup>	3.9(1.3-4.9) x10 <sup>5</sup>
<b><i>A. parasiticus</i></b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>bc</b>	<b>d</b>	<b>de</b>
5	0	17.4 (7.1-26.0) x10 <sup>5</sup>	7.0 (4.9-10.6) x10 <sup>5</sup>	1.9 (1.6-2.3) x10 <sup>5</sup>	0.9 (0.7-1.2) x10 <sup>5</sup>
10	0	3.2 (3.1-4.0) x10 <sup>5</sup>	3.0 (2.8-3.5) x10 <sup>5</sup>	2.4 (2.0-2.6) x10 <sup>5</sup>	1.3 (1.0-3.0) x10 <sup>5</sup>
15	0	30.5 (11.4-50.2) x10 <sup>5</sup>	17.8 (6.9-40.6) x10 <sup>5</sup>	3.1 (2.6-4.6) x10 <sup>5</sup>	3.9 (2.2-6.8) x10 <sup>5</sup>
20	0	5.6 (5.3-5.8) x10 <sup>5</sup>	15.8 (5.6-47.1) x10 <sup>5</sup>	26.7 (4.8-31.3) x10 <sup>5</sup>	15.2 (4.6-17.8) x10 <sup>5</sup>

\*Los valores presentados representan la mediana de esporas/mL y sus rangos. Diferencias significativas fueron detectadas con análisis no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann- Whitney ( $p \leq 0.05$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos.

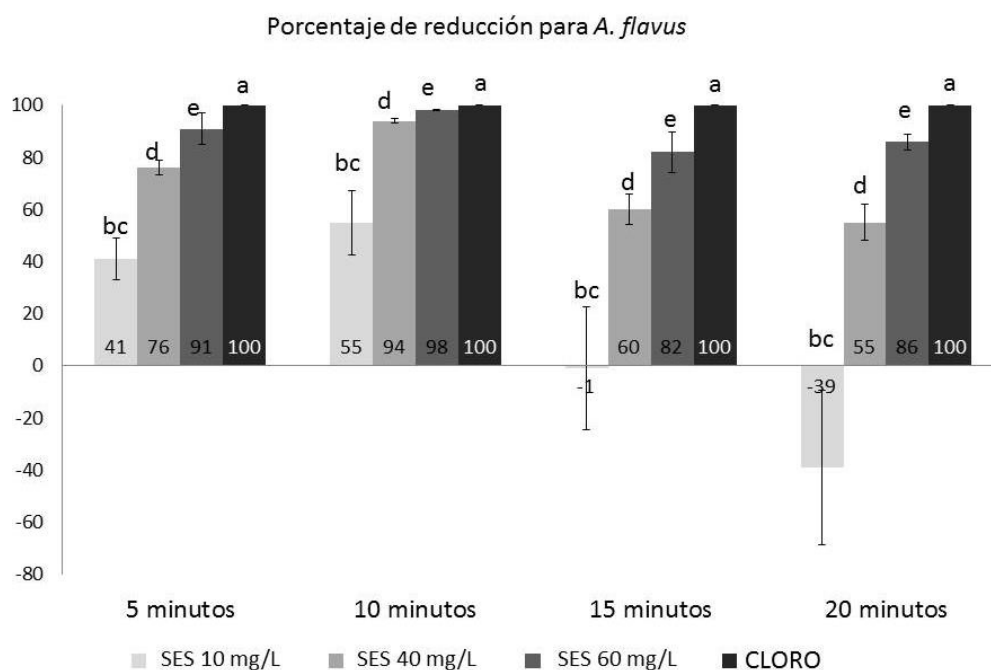




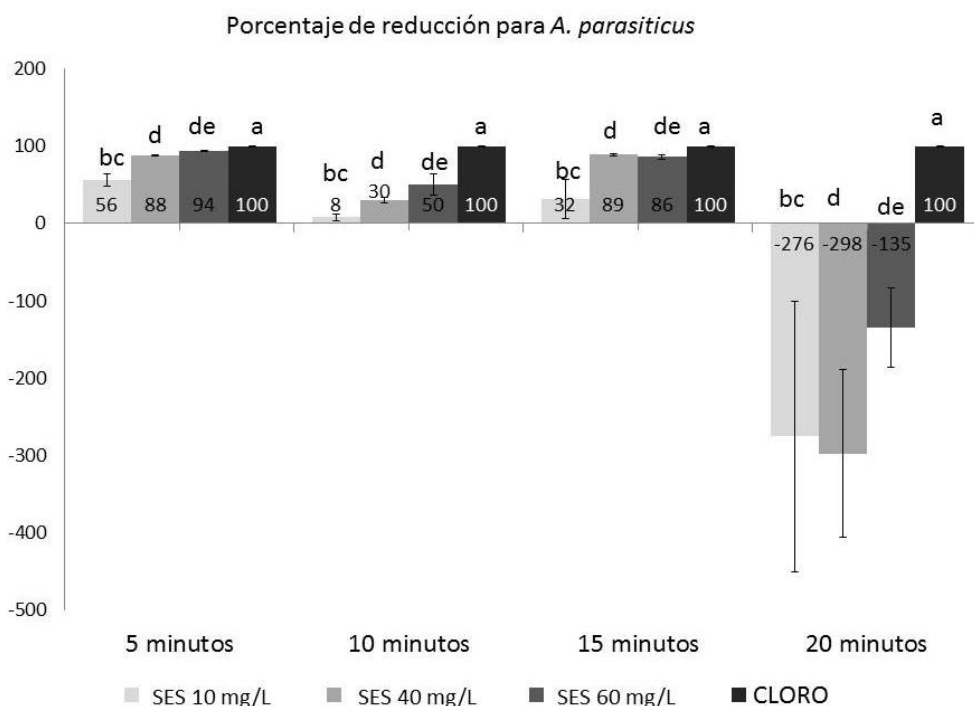
**Figura 15.** Reducción en la producción de esporas de *F. oxysporum* y error estándar a todos los tiempos de ensayo que corresponden a 5, 10, 15 y 20 min.



**Figura 16.** Reducción en la producción de esporas de *F. verticillioides* y error estándar a todos los tiempos de ensayo que corresponden a 5, 10, 15 y 20 min.



**Figura 17.** Reducción en la producción de esporas de *A. flavus* y error estándar a todos los tiempos de ensayo que corresponden a 5, 10, 15 y 20 min.



**Figura 18.** Reducción en la producción de esporas de *A. parasiticus* y error estándar a todos los tiempos de ensayo que corresponden a 5, 10, 15 y 20 min. Los valores negativos para 20 min expresan un incremento en el conteo de esporas comparado con la solución control de agua. El agua no se graficó ya que se usó como control y el porcentaje de reducción de cada tratamiento fue calculado en base a la diferencia de estos contra el control (explicación página 39).

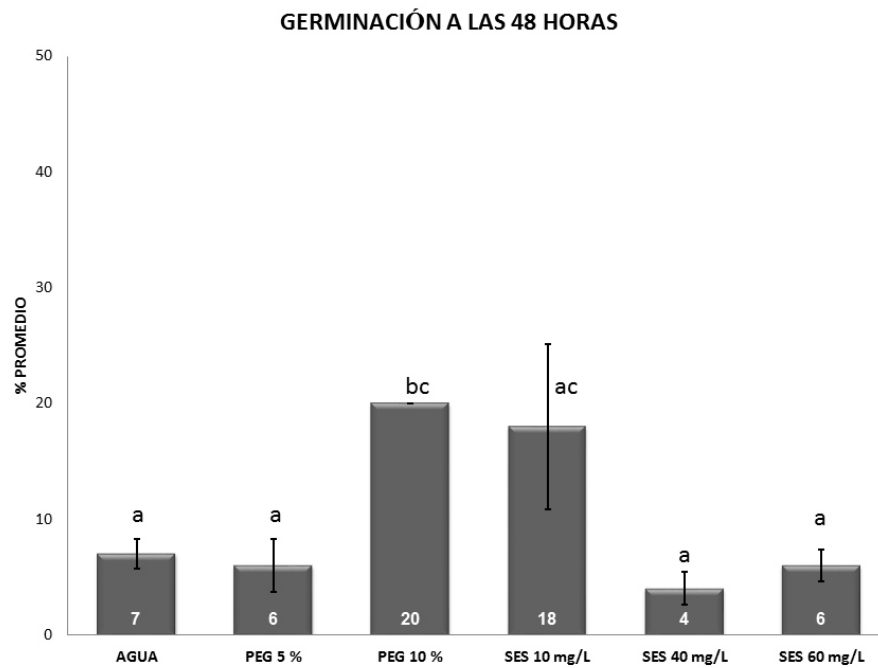
### 4.3 Resultados de las pruebas de inocuidad de la SES

La SES no afectó la germinación de las semillas de jitomate (**Tabla 3**). Se detectaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) con pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Los valores presentados (**Figuras 19-21**) muestran el promedio en porcentaje de germinación de semillas de las 4 réplicas.

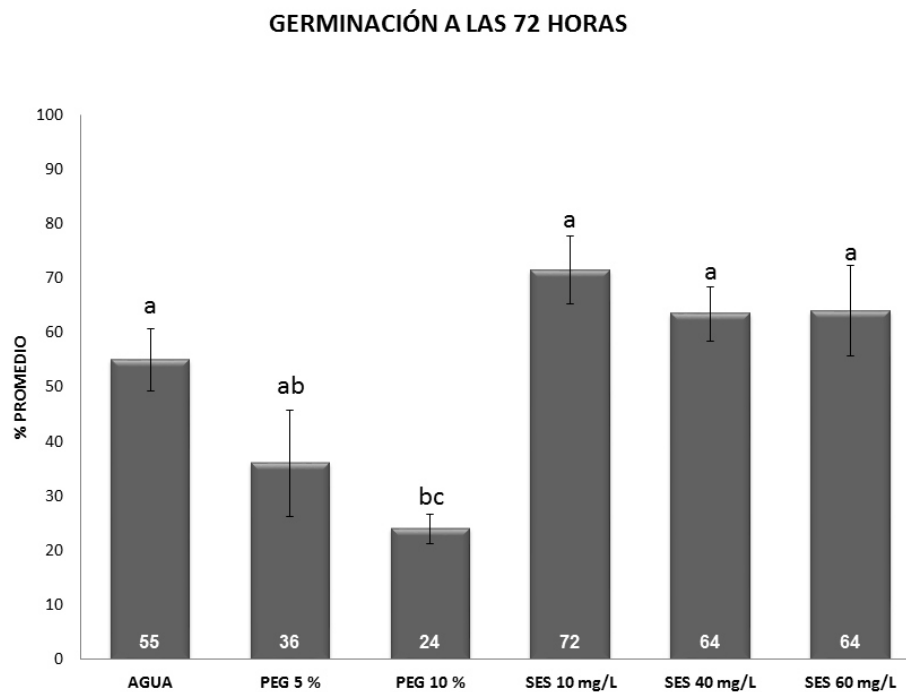
**Tabla 3. Inocuidad de la SES en la germinación**

TIEMPO	Tratamiento						
	COLORO	AGUA	PEG 5 %	PEG 10 %	SES 10	SES 40	SES 60
	a	b	b	b	b	b	b
<b>48 h</b>	0	3.5 (2-5)	3 (1-5)	10	7 (3-19)	1.5 (1-4)	3.5 (1-4)
<b>72 h</b>	0	25.5 (23-36)	18.5 (6-29)	11 (10-16)	34.5 (30-44)	33 (25-36)	31.5 (23-42)
<b>96 h</b>	0	37.5 (32-46)	31.5 (20-39)	17 (10-28)	43.5 (38-44)	38.5 (33-40)	39.5 (34-45)

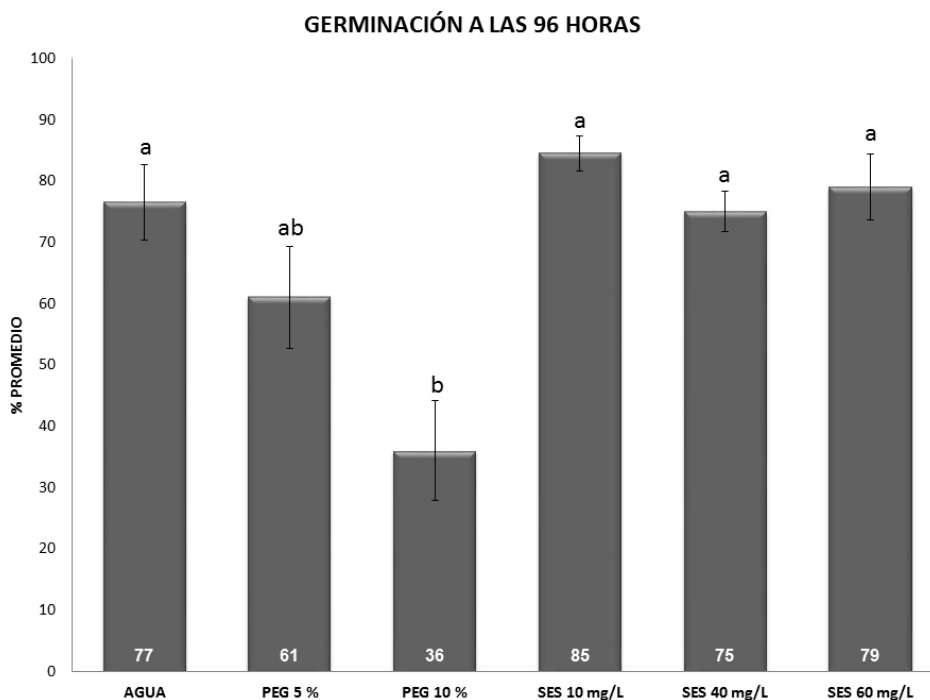
\*Los valores presentados muestran la mediana de 4 réplicas de 50 semillas las cuales germinaron. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 19.** Porcentaje de germinación de semillas y error estándar de grupos control y tratamientos con SES a las 48 h.



**Figura 20.** Porcentaje de germinación de semillas y error estándar de grupos control y tratamientos con SES a las 72 h.



**Figura 21.** Porcentaje de germinación de semillas y error estándar de grupos control y tratamientos con SES a las 96 h.

Los resultados de los análisis proximales mostraron similitudes en los parámetros evaluados (**Tabla 4**). Las muestras se analizaron en duplicados y su comparación estadística fue empleando la prueba T-test. No se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre las semillas control y las tratadas con la SES de 60 mg/L de cloro activo.

**Tabla 4. Análisis proximal de semillas control y tratadas con la SES**

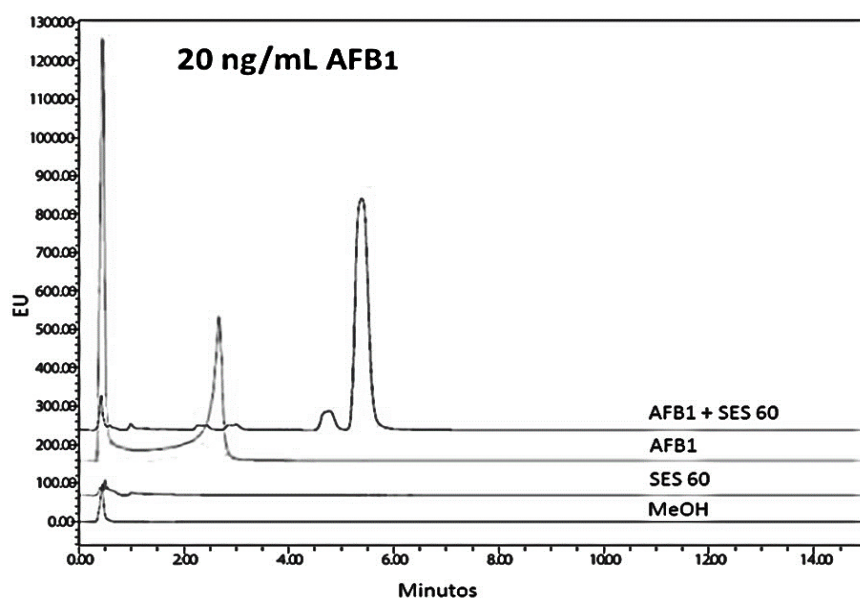
<b>Parámetros (%)</b>	<b>Control (Agua)</b>	<b>SES (60 mg/L)</b>
Materia seca	94.04 ± 0.18	94.03 ± 0.01
Ceniza	4.01 ± 0.01	4.07 ± 0.04
Proteína	27.75 ± 0.23	29.53 ± 0.53
Lípidos	16.18 ± 0.49	17.59 ± 0.19
Fibra cruda	32.10 ± 0.42	32.14 ± 0.09
Extracto libre de Nitrógeno	13.97 ± 0.49	11.01 ± 0.30

\*No se encontraron diferencias significativas usando la prueba T-test ( $p \geq 0.05$ ). Porcentajes promedio de 2 réplicas.

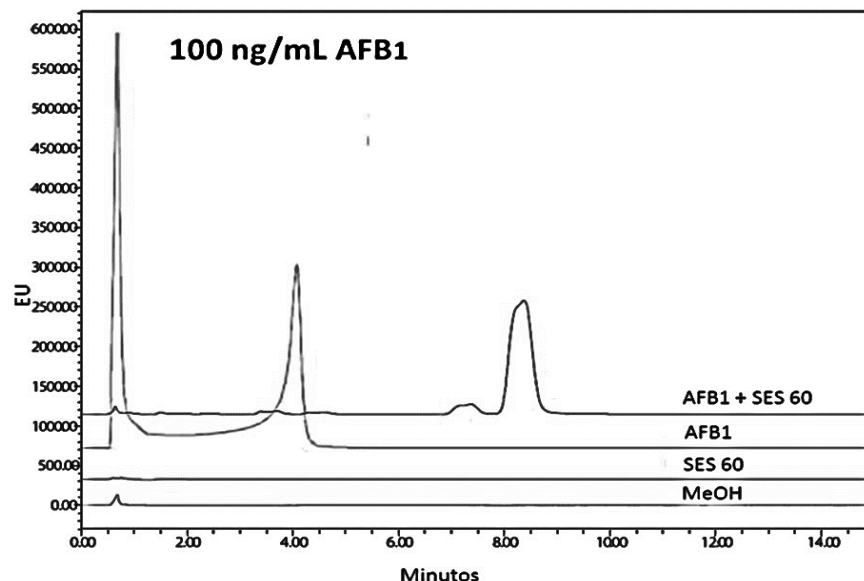
#### **4.4 Resultados de cromatografía de AFB<sub>1</sub> por UPLC**

Referente a la conversión de AFB<sub>1</sub> con la SES se obtuvieron resultados con cromatografía líquida que documentaron el cambio del tiempo de retención de la AFB<sub>1</sub> desafiada con la SES a 60 mg/L de cloro libre comparada con el estándar de AFB<sub>1</sub> (**Figuras 22 y 23**). El control de aflatoxina (20 y 100 ng/mL) fue disuelta en acetonitrilo previo a la inyección que reveló un pico al minuto 2.7 en el cromatograma. Cuando se mezcló la AFB<sub>1</sub> + SES a 60 mg/L de cloro libre en proporción 1:1, se observó un cambio en los tiempos de retención (min 4.8 y 5.4). Este cambio puede estar relacionado a la posible adición de -Cl y -OH en el anillo de furano de la molécula y al cambio de carga de la molécula que tiende a ser más positiva como se ha reportado por Xiong et al. (2012). Otra posible explicación

son las diferencias en las condiciones de inyección, ya que la AFB<sub>1</sub> + SES 60 fue inyectada directamente (disuelta en ACN:SES proporción 1:1) y no evaporada para re-suspenderse en acetonitrilo antes de su inyección en el cromatógrafo.



**Figura 22.** Cromatograma de dosis baja de AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>1</sub> +SES 60 mg/L de cloro libre. En el min 2.7 se muestra el pico de aflatoxina (20 ng/mL) disuelta en acetonitrilo; picos al min 4.8 y 5.4 (SES 60 + AFB<sub>1</sub>) muestran un cambio en el tiempo de retención que puede estar relacionado a la posible adición de -Cl y -OH en la molécula (anillo de furano), cambio de carga de la molécula (positiva) como se reporta por otros autores (Xiong et al., 2012), o a las diferencias en las condiciones de inyección.

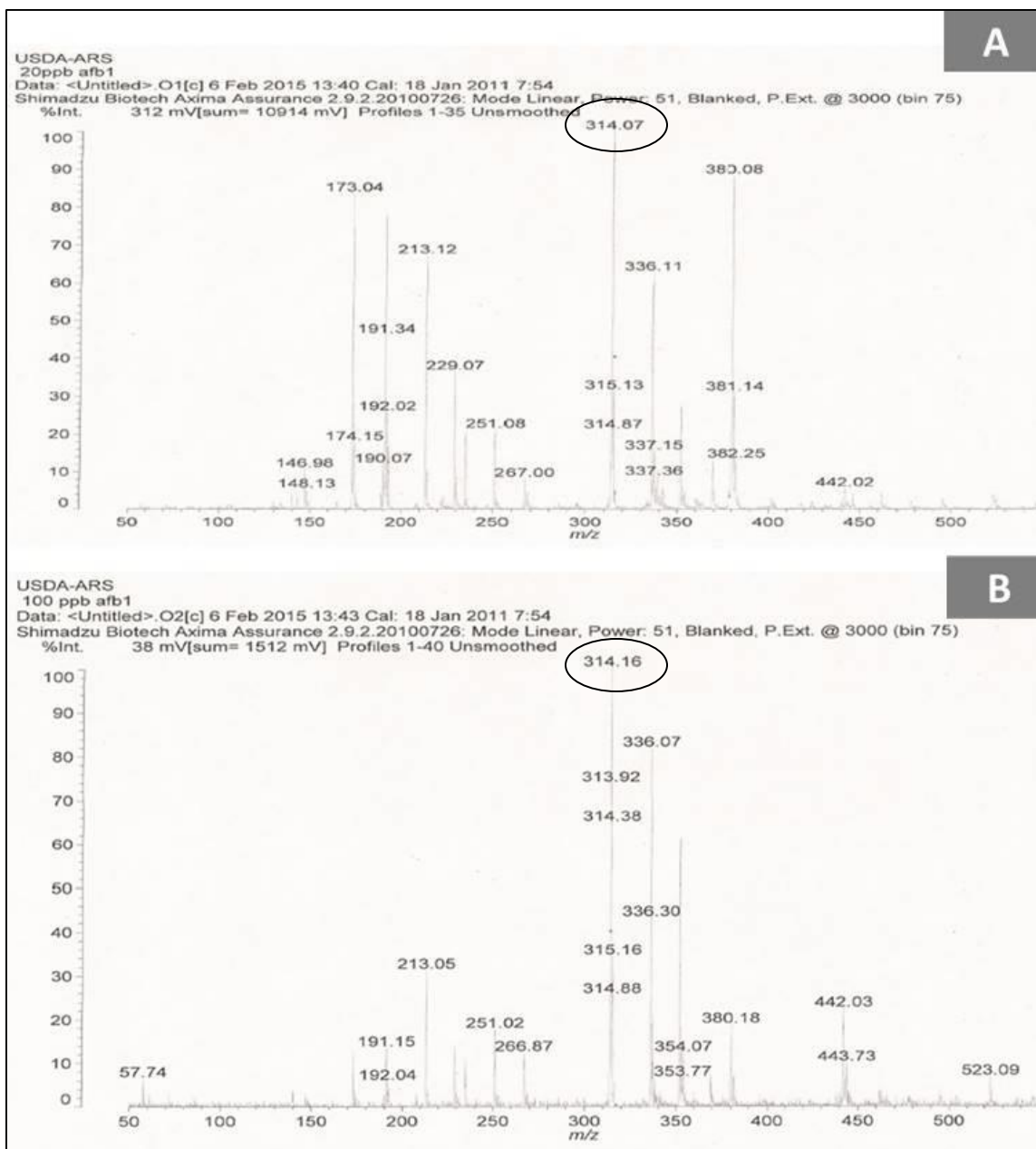


**Figura 23.** Cromatograma de dosis alta de AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>1</sub> + SES a 60 mg/L de cloro libre. En el min 4.2 se muestra el pico de aflatoxina (100 ng/mL); picos del min 7.5 y 8.6 muestran el cambio del tiempo de retención de la aflatoxina cuando se combina con la SES a 60 mg/L de cloro libre.

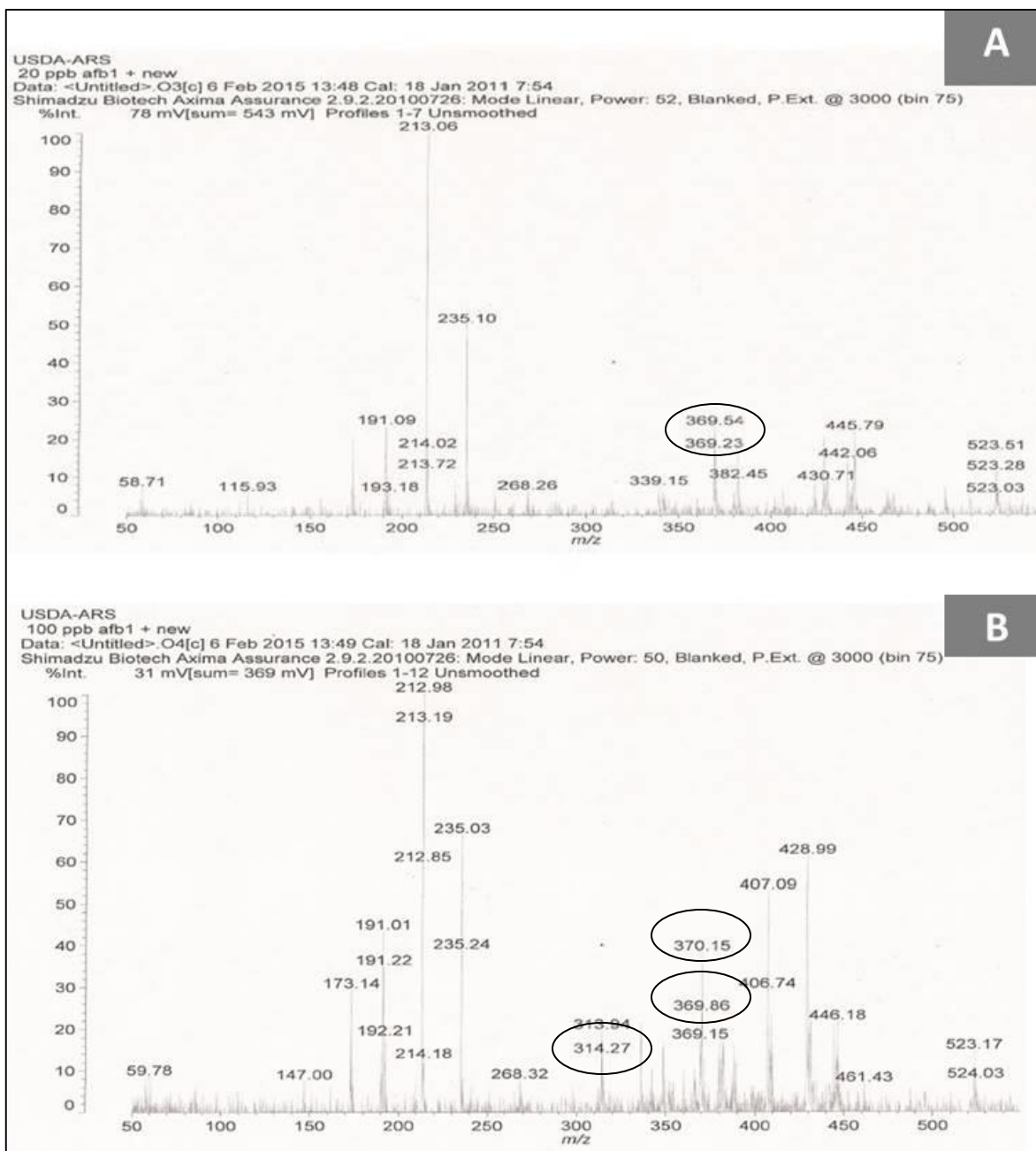
#### 4.5 Resultados de conversión de AFB<sub>1</sub> por MS

La espectrometría de masas mostró evidencia preliminar de la formación de un nuevo compuesto que pudiera ser compatible con el reportado por otros autores como 8-hidroxi-9-cloro-aflatoxina B1 (Xiong et al., 2012). (**Figuras 24 y 25**). La masa de AFB<sub>1</sub> fue detectada como  $\approx 314$  m/z y la masa compatible con el producto generado fue de  $\approx 369$ -370 m/z.





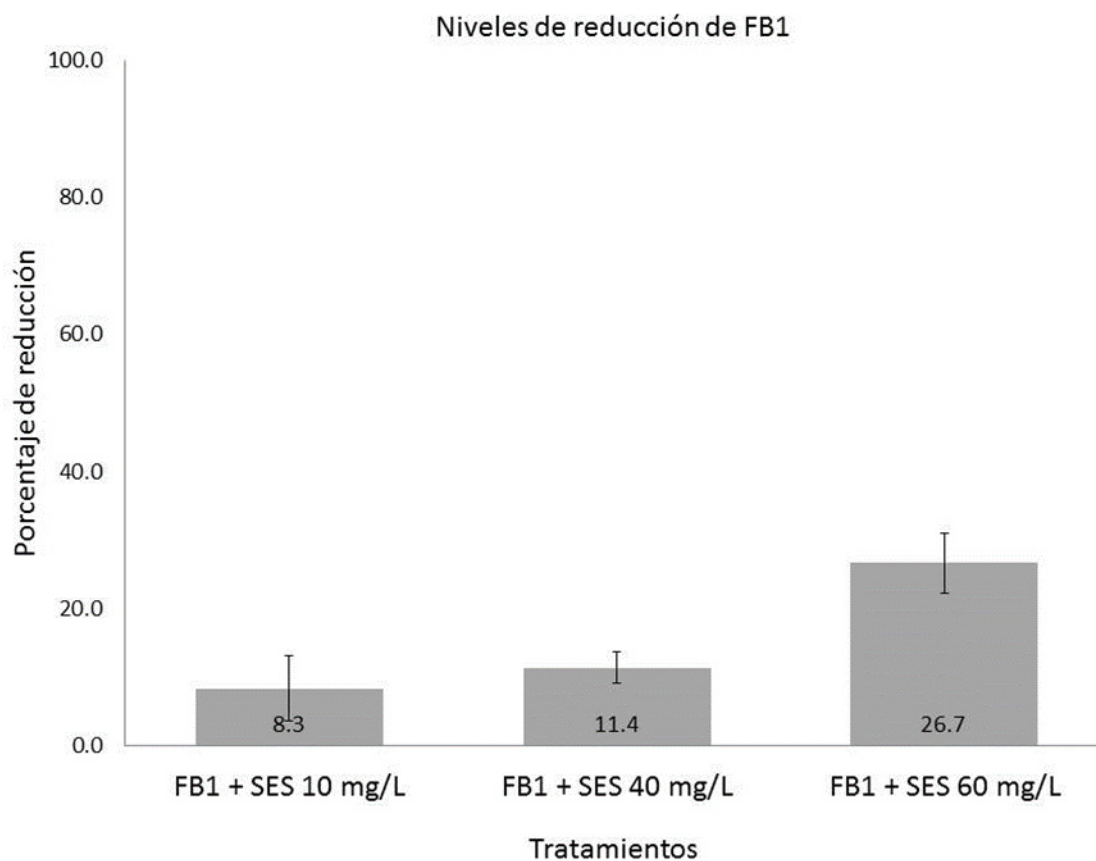
**Figura 24.** Espectrometría de masas. A: AFB1 control a 20 ng/mL, B: AFB1 control a 100 ng/mL.



**Figura 25.** Masas de compuestos de conversión. A: AFB<sub>1</sub> a 20 ng/mL incubada con SES 60. B: AFB<sub>1</sub> a 100 ng/mL incubada con SES 60.

#### 4.6 Resultados de la reducción de FB<sub>1</sub> por fluorometría

Los resultados con fluorometría mostraron una reducción del 8.3% de la FB<sub>1</sub> con la SES a 10 mg/L de cloro libre, un 11.3% con la SES a 40 mg/L y de un 26.6% con la SES a 60 mg/L de cloro libre (**Figura 26**).



**Figura 26.** Porcentaje promedio y error estándar de la reducción de FB<sub>1</sub> empleando la SES a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre, como controles se empleó MeOH libre de FB<sub>1</sub> y la FB<sub>1</sub> a 4 mg/L suspendida en MeOH.

## 5. DISCUSIÓN

La SES son soluciones que se han usado efectivamente para reducir la contaminación por microorganismos en alimentos (Al-Haq et al., 2005) y existe evidencia de que pueden ser eficaces para ciertos hongos como *Aspergillus* (Bonde et al., 1999) y *Fusarium* (Audenaert et al., 2012). El mecanismo de acción probable involucra incremento en la permeabilidad de la espora causada por el  $\cdot\text{OH}$  presente en la SES. Este compuesto causa fuga de iones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  causando disrupción de la integridad de la espora (Xiong et al., 2010) lo que da por resultado una reducción de la capacidad de las esporas para germinar.

Los diferentes niveles de cloro libre en la SES utilizada en este trabajo mostraron una capacidad variable para afectar a los distintos hongos. Para *F. oxysporum* el tratamiento de SES 40 a 15 min presentó mayor producción de esporas que el tratamiento a 5 min, lo mismo sucedió con la SES 60 a los 15 min que mostró mayor producción de esporas en comparación con los tratamientos de esta concentración a los 10 y 20 min de exposición y con la SES 10 a los 4 distintos tiempos se tuvo una menor producción de esporas a los 10 min. Para *F. verticillioides* la SES 10 mostró un repunte de esporas a los 15 min, de igual manera sucedió con la SES 40 a los 15 min; para la SES 60 el tiempo en el que se presentó un menor número de esporas fue a los 5 min, incrementando a los 10 min y disminuyendo nuevamente a los 15 y 20 min. Para *A. flavus* se obtuvo un incremento en la producción de esporas a los 20 min con la SES 10 en comparación con el agua y la SES 60 a los 20 min tuvo un repunte en

comparación con los otros tiempos pero las esporas fueron menores en comparación con el control agua. En el caso de *A. parasiticus* hubo un aumento en los niveles de esporas para las tres concentraciones de SES a los 20 min en comparación con el agua, lo cual puede deberse a que el hongo produce más esporas bajo condiciones de estrés siendo en este caso una exposición a 20 min en SES; sin embargo, en este estudio no se verificó la viabilidad de las esporas. Algo que podría explicar estos efectos de la SES y el cloro sobre el incremento en la producción de esporas de los hongos es el hecho de que las especies de *Aspergillus* son considerados xerófilos, es decir son capaces de crecer en condiciones de humedad bajas ( $\leq 0.85$  actividad de agua) y han desarrollado mecanismos fisiológicos que les permiten crecer en condiciones estresantes (Vinnere Pettersson y Leong, 2011) como lo podría ser en presencia de cloro a dosis bajas. Algunos estudios reportan que en ciertos hongos como *A. niger* 26 el estrés por calor promueve la síntesis de enzimas que ayudan a neutralizar especies reactivas de oxígeno (Abrashev et al., 2005), en el caso de *A. oryzae* se tiene documentado el mecanismo de respuesta a proteínas desdobladas el cual reduce el estrés del retículo endoplásmico ayudándolo en medios desfavorables (Tanaka et al., 2015).

Se desconoce si el estrés generado por la exposición a la SES o al cloro a dosis bajas (10-60 mg/L) ocasiona un estrés similar en los hongos y las diferencias en la capacidad de respuesta a proteínas desdobladas en las cepas de hongos de este trabajo de tesis pero se sabe que el mecanismo principal de acción fungicida

de la SES es la producción de ROS los cuales pudieran ser neutralizados proporcionando la adaptación de estos hongos a los tratamientos.

La efectividad de la SES depende de los niveles de  $\bullet\text{OH}$  y esta efectividad es variable de acuerdo al contacto con la materia orgánica (Gómez-López, 2012).

La publicación de Xiong et al., 2010 demuestra que la SES de pH neutro es efectiva para inactivar esporas de *A. flavus*. En sus experimentos, 100  $\mu\text{L}$  de solución de esporas [ $7.3\text{--}7.5 \times 10^6$  esporas/mL] fueron expuestas a SES de pH neutro [60 mg/L] por 60 segundos y no se detectó viabilidad de las esporas después del tratamiento al incubarse diluciones de las esporas tratadas con SES. En los resultados de esta tesis existió variación ya que se infectó a las semillas con soluciones de esporas que variaron entre 2 a  $2.5 \times 10^6$  esporas/mL. A pesar ser una dosis más baja en comparación con el estudio de Xiong y colaboradores (Xiong et al, 2010), en el presente estudio las semillas fueron sumergidas en esta solución por 20 min lo que pudo permitir una mejor fijación de las esporas en las semillas y culminar en una mayor conteo de esporas a partir de las semillas inoculadas e incubadas por 3 días.

Para el caso de *Fusarium*, existe poca literatura disponible que haya empleado SES con pH neutro en el tratamiento de semillas. Uno de estos estudios demuestra que la SES con pH neutro ha sido investigada para controlar el crecimiento de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* y *F. avenaceum* (Audenaert et al., 2012). Específicamente en el estudio de Audenaert y colaboradores, la SES a 400 mg/L se empleó en granos de trigo para controlar infección por *F.*

*graminareum* observando buenos resultados de inhibición de germinación de esporas y reducción de la producción de metabolitos (ej. ergosterol) en semillas (1g) incubadas por 14 días. Existen muchas diferencias entre ese estudio y este trabajo ya que la SES usada en el mencionado estudio fue verificada que contenía 400 mg/L de OCl, una concentración de cloro libre mayor que la empleada en la presente investigación. También, la concentración de esporas usada para inocular a los granos fue más baja que este estudio, 100µL [ $10^6$  esporas/mL] comparada con 2 a  $2.5 \times 10^6$  esporas/mL. En este trabajo, se usó una cepa de *F. oxysporum* y *F. verticillioides* a diferencia de Audenaert y colaboradores.

El porcentaje de germinación no se vio afectado por el uso de la SES y es de interés el hecho de la germinación se incrementó con la SES a sus distintas concentraciones a partir de las 72 h en comparación con el agua. De acuerdo a Wenny y Dumroese (1987), el tratamiento con cloro comercial al 5.25% puede ser bien soportado por semillas de cubierta gruesa (coníferas) las cuales soportan de manera favorable los efectos oxidantes del cloro. Específicamente para jitomate se ha usado el lavado con cloro a 2.7% durante 30 min con buenos resultados (Rick 2015).

Concerniente a los parámetros nutrimentales de las semillas tratadas con SES, estos no fueron afectados por el tratamiento con SES a 60 mg/L de cloro libre.

Con respecto a la degradación de metabolitos tóxicos como AFB<sub>1</sub> y FB<sub>1</sub>, existe poca literatura que documente este efecto de la SES. Un estudio por Xiong

et al. (2012) muestra resultados similares a este trabajo donde se observa la conversión de AFB<sub>1</sub> a otro compuesto similar que se sugiere tiene nula toxicidad, en ese estudio, usando cromatografía líquida se documentó la conversión de AFB<sub>1</sub> a un compuesto con un tiempo de retención mayor y que se determinó tiene carga positiva. En el presente estudio, también con cromatografía de líquidos (UPLC) se observó un cambio en el tiempo de retención de AFB<sub>1</sub> + SES 60 mg/L comparada con el estándar de AFB<sub>1</sub>. Este cambio pudo estar relacionado a las diferentes condiciones de inyección entre el estándar de AFB<sub>1</sub> (ACN) y la mezcla de la AFB<sub>1</sub> + SES 60 mg/L (ACN:SES, proporción 1:1). En el mismo estudio, Xiong y colaboradores analizaron la conversión de AFB<sub>1</sub> con espectrofotometría de masas, registrando la AFB<sub>1</sub> con un peso de 312 m/z, mientras que el compuesto de conversión se presentó con un peso de 364 m/z y la fórmula molecular propuesta se obtuvo con un equipo de alta resolución Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (HR-FT-ICR-MS) (Bruker Co. Ltd., United States). En el presente trabajo de tesis, el peso molecular probable para la AFB<sub>1</sub> fue de  $\approx$  314 m/z. Mientras que para el probable compuesto de conversión fue de  $\approx$  369-370 m/z. Para FB<sub>1</sub> no hay ningún reporte del uso de SES para degradar este compuesto. Los resultados del presente estudio con fluorimetría revelan evidencia de una ligera conversión de esta molécula después de la incubación de 4 mg/L de FB<sub>1</sub> con SES a 60 mg/L durante 20 min. Sin embargo, se requieren más estudios con diferentes condiciones experimentales para validar esta conversión y para elucidar los posibles cambios estructurales que la SES ocasiona sobre FB<sub>1</sub> y otras fumonisinas.



En este estudio no se contempló la verificación de la viabilidad de las esporas tratadas con la SES, lo cual queda como área de oportunidad para mejorar en estudios posteriores. Otras áreas a investigar pueden relacionarse a las diferentes condiciones de fabricación de la SES ya que se sabe que el voltaje del equipo de electrolisis juega un papel importante en la concentración de  $\cdot\text{OH}$  que es el ingrediente activo principal. Por último, los estudios de conversión de  $\text{AFB}_1$  y  $\text{FB}_1$  presentados en este trabajo son evidencia preliminar del potencial de la SES para modificar estas toxinas y requieren ser investigados con más detalle.

## 6. CONCLUSIONES

El uso de la SES de pH neutro a 10, 40 y 60 mg/L de cloro libre es efectivo para reducir la contaminación por hongos *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* de manera variable, ya que estos hongos poseen características diferentes para reaccionar ante las condiciones de estrés. Así mismo se concluye que el uso de la SES no afectó el porcentaje de germinación ni los parámetros nutrimentales de las semillas de jitomate.

En cuanto al efecto de la SES sobre la conversión de AFB<sub>1</sub> se observó una similitud con lo que otros autores han reportado, donde al incubar la SES y esta toxina se produce un compuesto distinto que se sugiere es de nula toxicidad según la literatura. Para el caso de FB<sub>1</sub>, la SES mostró cierta capacidad para reducir la concentración y esta disminución fue dependiente de la concentración de la SES.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abrashev, R., Dolashka, P., Christova, R., Stefanova, L., y Angelova, M. (2005). Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 902-909.
- Al-Askar, A. A., Ghoneem, K. M., Rashad, Y. M., Abdulkhair, W. M., Hafez, E. E., Shabana, Y. M., y Baka, Z. A. (2014). Occurrence and distribution of tomato seed-borne mycoflora in Saudi Arabia and its correlation with the climatic variables. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 556–569. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12137>
- Al-Haq, M.I. y Sugiyama, J. (2004). Application of electrolyzed water in food processing. Presented at 2004 ASAE/CSAE annual meeting, Ottawa Canada, August 1–4, ASAE paper No. 04-6178.
- Al-Haq, M.I., Sugiyama, J. y Isobe, S. (2005). Applications of Electrolyzed Water in Agriculture and Food Industries. *Food Science and Technology Research*. 11(2):135-150.
- Albrich, J. M., Gilbaugh Tercero, J. H., Callahan, K. B., y Hurst, J. K. (1986). Effects of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 78(1), 177.
- Amaiike, S., y Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 107-133.
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., y Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: II. Herencia de la resistencia a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en tres especies del género *Lycopersicon*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 180-183.
- Atkinson, R., y Arey, J. (2003). Atmospheric degradation of volatile organic compounds. *Chemical Reviews*, 103(12), 4605-4638.
- A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. EUA.

- Audenaert, K. Monbaliu, S., Deschuyffeleer, N., Maene, P. N., Vekeman, F., Haesaert G., Saeger, S.D., Eeckhout, M. (2012). Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium spp.* in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis. *Food Control*. 23: 515-521.
- Aziz, N.H., Attia, E.S.A., y Farag, S.A. (1997). Effect of gamma irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, Xour, and bread. *Nahrung*, 41, 34-37.
- Aziz, N. H., Matter, Z. A., y Shahin, A. A. M. (2005). Detection of fumonisin B1 produced by *Fusarium moniliforme* and its control by gamma radiation and food preservatives. *Egyptian Journal of Microbiology*., 10, 96–107.
- Aziz, N. H., Ferial, M., Shahin, A. A., y Roushy, S. M. (2007). Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B 1 in seeds by gamma-irradiation. *Food Control*, 18(11), 1337-1342.
- Bacon, C. W., Bennett, R. M., Hinton, D. M., y Voss, K. A. (1992). Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease (USA)*. 76(2), 144-148.
- Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., y Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66(4), 542-548.
- Barrette Jr, W. C., Hannum, D. M., Wheeler, W. D., y Hurst, J. K. (1989). General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry*, 28(23), 9172-9178.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., y Parr - Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649-662.
- Bennett JW y Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16(3):497-516.
- Bonde, M. R., Nester, S. E., Khayat, A., Smilanick, J. L., Frederick, R. D., y Schaad, N. W. (1999). Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on *Tilletia indica teliospore germination*. *Plant Disease Journal*. 83:627-632.

- Buck, J., Van Lersel, M., Oetting, R., y Hung, Y.-C. (2002). In vitro fungicidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water. *Plant Disease*, 86(3), 278-281.
- Bullerman, L. B., y Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 140-146.
- Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., y Revol, A. (2001). Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, 163(2), 153-162.
- Damicone, J.P. y Brandenberger L. Common diseases of tomatoes. Part I. Diseases caused by fungi. Oklahoma cooperative extension service. EPP-7625, 1-6. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University. <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-1323/EPP-7625web.pdf>
- Deza, M.A., Araujo, M. y Garrido, M.J. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolysed water. *Letters in Applied Microbiology*. 37, 482–487.
- De Granada, E. G., De Amézquita, M. O., Bautista, G. R., y Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7.
- El-Aziz, A. R. A., Al-Othman, M. R., Al-Sohaibani, S. A., Mahmoud, M. A., y Murugan, K. (2012). Prevention of aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus* through aqueous plant extracts in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*, 6(41), 6931-6935.
- Elwakil, M. A., Abdalla, M. E., y Mathur, S. B. (1998). *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* races 1 and 2 associated with tomato seeds in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)*.
- FAO (2009). Specifications and evaluations. for prochloraz. Páginas 1-21. [www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/.../Prochloraz\\_2009.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/.../Prochloraz_2009.pdf)
- FAO (1994). Joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the who expert group on pesticide residues [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation94/prelim.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation94/prelim.pdf)
- Franco, C. H., dos Santos, V. H., Silva, L. P., Arthur, V., y Silva, R. M. (2015). Mutagenic potential of lettuce grown from irradiated seeds. *Scientia Horticulturae*, 182, 27-30.

- Fungi de Gran Bretaña e Irlanda. <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/aspergillus-parasiticus>. Visitado en noviembre 2015.
- Gharib, O. H., y Aziz, N. H. (1995). Effect of gamma irradiation and storage periods on the survival of toxigenic microorganisms and khapra beetle *Trogoderma granarium* in crushed corn. *Journal of the Egyptian Society of Toxicology*, 15, 23–28.
- Gómez-López, V. M. (2012). Decontamination of fresh and minimally processed produce. Wiley-Blackwell Publication. Section II Decontaminants. 135-157.
- Graham, D.M. (1997). Use of ozone for food processing. *Food Technology* 51:72–75.
- Guentzel, J.L., Lam, K.L., Callan, M.A., Emmons, S.A. and Dunham, V.L. (2008). Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service area using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*. 25, 36–41.
- Hammami, W., Fiori, S., Al Thani, R., Kali, N. A., Balmas, V., Migheli, Q., y Jaoua, S. (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, 37, 177-181.
- Harmon, G. G., y F. L. Pfleger. (1974) "Pathogenicity and infection sites of *Aspergillus* species in stored seeds." *Phytopathology*. 64.10: 1339-1344.
- Hacıbekiroğlu, I., y Kolak, U. (2013). Aflatoxins in various food from Istanbul, Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 6(4), 260-264.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., y Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6), 1677-1692.
- Hirano, H. y Ueda, O. (1997). Characteristics of electrolyzed neutral water and possibility of the practical use for food hygiene. *Shokuhin Kogyo*, Japan, 40, 25–35.
- Horn, B. W., Ramirez-Prado, J. H., y Carbone, I. (2009). The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 101(2), 275-280.
- Howard, P. C., Eppley, R. M., Stack, M. E., Warbritton, A., Voss, K. A., Lorentzen, R. J., y Bucci, T. J. (2001). Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 2), 277.

- Hurst, J. K., Barrette, W. C., Michel, B. R., y Rosen, H. (1991). Hypochlorous acid and myeloperoxidase - catalyzed oxidation of iron - sulfur clusters in bacterial respiratory dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 1275-1282.
- IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: World Health Organization. Vol. 82.
- IARC. (2012). A review of human carcinogens (Vol. 100F). Lyon, France: IARC.
- Ito, Y., Muraguchi, H., Seshime, Y., Oita, S., y Yanagi, S. O. (2004). Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b 560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Molecular Genetics and Genomics*, 272(3), 328-335.
- Jiang, J., Wu, S., Wang, Y., An, X., Cai, L., Zhao, X., y Wu, C. (2015). Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1473-1481.
- Jurgenson, J. E., Zeller, K. A., y Leslie, J. F. (2002). Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1972-1979.
- Kim, C., Hung, Y. C., y Brackett, R. E. (2000). Roles of oxidation–reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection*, 63(1), 19-24.
- Lamprecht, S., Marasas, W., Alberts, J., Cawood, M., Gelderblom, W., Shephard, G., Calitz, F. (1994). Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology*, 84(4), 383-391.
- Leslie, J.F., y Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual (Vol 2, No. 10). Ames, IA, USA: Blackwell Pub.
- Len, S. V., Hung, Y. C., Erickson, M., y Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal of Food Protection*, 63(11), 1534-1537.
- Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S., y Calvo, A. M. (2006). FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1418-1432.

- Lixin, D., Chuan, H., Shumei, Z., Wei, C., y Jian, D. (2010). The Effect of Electrolyzed Water on Chinese Cabbage Seeds Germination. *Journal of Agricultural Mechanization Research*, 2, 043.
- Maita, K., Tsuda, S., y Shirasu, Y. (1991). Chronic toxicity studies with thiram in Wistar rats and beagle dogs. *Toxicological Sciences*, 16(4), 667-686.
- Manabe, M., Kanda, S., Fukunaga, K., Tsubura, A., y Nishiyama, T. (2006). Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(5), 413-421.
- Marasas, W. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 2), 239.
- Marasas, W. F., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C., Merrill, A. H. (2004). Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 711-716.
- Mariutti, L. R. B., y Soares, L.M.V. (2009). Survey of aflatoxins in tomato products. *Food Science and Technology*, 29(2), 431-434.
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., y Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220-230.
- Marroquín-Cardona, A. G. (2011). Characterization and safety of clays as potential dietary supplements to prevent aflatoxicosis. Dissertation Submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University in partial fulfillment of the requirements for the degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY. Approved May 2011.
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78-92.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., y Carlton, W. M. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87(2), 209-217.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., y Cook, R. J. (1981). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania State University Press.



- Nishikawa, J., Kobayashi, T., Shirata, K., Chibana, T., and Natsuaki, K.T. (2006) Seed-borne fungi detected on stored solanaceous berry seeds and their biological activities. *Journal of General Plant Pathology* 72: 305-313.
- Okun, D. O., Khamis, F. M., Muluvi, G. M., Ngeranwa, J. J., Ombura, F. O., Yongo, M. O., y Kenya, E. U. (2015). Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. *Agriculture & Food Security*, 4(1), 1.
- Olsen, M., Johnsson, P., Möller, T., Paladino, R., y Lindblad, M. (2008). *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts?. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 123-126.
- Park, C. M., Hung, Y. C., Doyle, M. P., Ezeike, G. O. I., y Kim, C. (2001). Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Science*, 66(9), 1368-1372.
- Park, E. J., Alexander, E., Taylor, G. A., Costa, R., y Kang, D. H. (2009). The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. *Food Microbiology*, 26(4), 386-390.
- Pasqualotto AC. (2010) *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Springer, London.
- Productores de Hortalizas (2006). Plagas y enfermedades del tomate: Guía de identificación y manejo. Suplemento Especial de Marzo. [vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato\\_Spanish](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato_Spanish).
- Ramakrishna, N., Lacey, J., y Smith, J. E. (1991). Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 13(1), 47-54.
- Refai, M. K., Niazi, Z. M., Aziz, N. H., y Khafaga, N. E. M. (2003). Incidence of aXatoxin B1 in the Egyptian cured meat basterma and control by  $\gamma$ -irradiation. *Nahrung/Food*, 47, 377–382.
- Rick. C.M. (2015). [Tgrc.ucdavis.edu/sid\\_germ.aspx](http://Tgrc.ucdavis.edu/sid_germ.aspx). Consultado 4 Dic 2015.
- Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., Frias, J.M., Henahan, G.T.M. y Barat, J.M. (2008). Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintenance and shelf life extension of minimally processed lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9, 37–48.

- Riviere, J.L., Bach, J., Grolleau G. (1985). Effects of Prochloraz on drug metabolism in the Japanese Quail, Grey Partridge, Chicken and Pheasant. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 14 (3), p299-306.
- Roberts, T. R., y Hutson, D. H. (1999). Metabolic pathways of agrochemicals: insecticides and fungicides (Vol. 1). Royal Society of Chemistry.
- Robinson, A., Johnson, N. M., Strey, A., Taylor, J. F., Marroquin-Cardona, A., Mitchell, N. J.,...y Phillips, T. D. (2012). Calcium montmorillonite clay reduces urinary biomarkers of fumonisin B1 exposure in rats and humans. Food Additives & Contaminants: Part A, 29(5), 809-818.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., y Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B<sub>1</sub> or G<sub>1</sub> by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. Mycotoxin Research, 26(4), 241-246.
- Selmanoğlu, G., Barlas, N., Songür, S., y KocSkaya, E. A. (2001). Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. Human and Experimental Toxicology, 20(12), 625-630.
- Sargent, Steven A.; Pullammanappallil, Pratap. (2008). Reduce Disposal Costs. American Vegetable Grower; Vol. 56 Issue 8, p22
- Shinha, K. K., y Bhatnagar, D. (1998). Mycotoxins in agriculture and food safety. CRC Press.
- SIAP (2014). <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., y Liu, X. (2004). Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection, 23(3), 243-247.
- Tanaka, M., Shintani, T., & Gomi, K. (2015). Unfolded protein response is required for *Aspergillus oryzae* growth under conditions inducing secretory hydrolytic enzyme production. Fungal Genetics and Biology. 85, 1-6.
- Ulrich, J. T., y Mathre, D. E. (1972). Mode of action of oxathiin systemic fungicides V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 110(2), 628-632.
- United States Environmental Protection Agency. (1997). Pesticide Fact Sheet: Azoxystrobin. <http://www.epa.gov/oppr001/factsheets/azoxystrobin.pdf>

- Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., y De Meulenaer, B. (2014). Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control*, 37, 165-170. *Crop Protection*, 23(3), 243-247.
- Venczel, L.V., Arrowood, M., Hurd, M. and Sobsey, M.D. (1997). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied Environmental Microbiology* 63, 1598–1601. See also errata in 63, 4625.
- Vinggaard, A.M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.S.†, Breinholt, V., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Dalgaard, M., Nellemann, C., Hass, U. (2005). Perinatal Exposure to the Fungicide Prochloraz Feminizes the Male Rat Offspring. *Toxicological Sciences* 85, 886–897. doi:10.1093/toxsci/kfi150.
- Vinnere Pettersson, O., y Leong, S. L. L. (2011). Fungal Xerophiles (Osmophiles). eLS.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., y Goliński, P. (2012). Occurrence of fumonisins in food-an interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*, 26(2), 491-499.
- Wenny, D. L., & Dumroese, R. K. (1987). Germination of conifer seeds surface sterilized with bleach. *Tree Planters' Notes*, 38(3), 18-21.
- Wong, J. J., y Hsieh, D. P. (1976). Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2241-2244.
- Xiong, K., Liu, H. j., y Li, L. t. (2012). Product identification and safety evaluation of aflatoxin B1 decontaminated by electrolyzed oxidizing water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9770-9778.
- Xiong K., Liu H.J., Liu R, Li, L.T. (2010). Differences in fungicidal efficiency against *Aspergillus flavus* for neutralized and acidic electrolyzed oxidizing waters. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 67-75.
- Yoshida, Y., Min, J-S., Park, J-B., Isobe, S. y Suzuki, T. (2003). Disinfecting rice seeds using acidic electrolyzed water. *Journal of the Society of Agricultural Structures, Japan*. 33(4), 31–27 (in Japanese with English abstract).
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.
- Zhang, C., Lu, Z., Li, Y., Shang, Y., Zhang, G., y Cao, W. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* on mung bean seeds

and sprouts by slightly acidic electrolyzed water. Food Control, 22(5), 792-796.